
VOLUMEN 24. 1971

ENERO - MARZO. NUMERO 1

Microbiología Española

Revista

*del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de la Sociedad Española de Microbiología*



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Antonio Portolés, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó, Prof. Juan Santa María, Dr. Gonzalo Sierra y Prof. Julio R. Villanueva.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y Publicaciones, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Calle de Joaquín Costa, 32 MADRID-6 (España)

Suscripción (4 números): España, 240 PTA; extranjero, 340 PTA

Número: España, 70 PTA; extranjero, 100 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

“Microbiología Española” publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en “Microbiología Española” podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son $18 \times 11,5$ cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, se ajustarán al siguiente orden: Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.

Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador (“editor”)], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez días para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas complementarias serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de “Microbiología Española”, Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

INDICE

	<u>Página</u>
Presencia de virus en nódulos de leguminosas producidos por <i>Rhizobium</i> , por <i>Amparo Vela</i>	1
Estafilococos hospitalarios resistentes a las betalactaminas, por <i>E. J. Perea, D. Dámaso y M. Moreno-López</i>	13
Hemadsorción inespecífica y específica sobre células de riñón de cerdo normales e infectadas con el virus de la peste porcina africana, por <i>Carmen Gil-Fernández, M.^a Luisa Alonso, A. García-Gancedo y E. Ronda</i>	23
Estudio microbiológico de margarinas alteradas. I. Aislamiento e identificación de especies: Levaduras, por <i>M. Castañón y B. Iñigo</i>	39
Estudio microbiológico de margarinas alteradas. II. Aislamiento e identificación de especies: Bacterias, por <i>M. Castañón y B. Iñigo</i>	49
Congreso Nacional de Microbiología	67
Nueva entidad biológica	67

CONTENTS

	<u>Page</u>
Virus infection within <i>Rhizobium</i> induced nodules, by <i>Amparo Vela</i>	1
Beta-lactamine resistant hospital staphylococci, by <i>E. J. Perea, D. Dámaso and M. Moreno-López</i>	13
Specific and non-specific hemadsorption by pig kidney cells infected and non-infected with the African swine fever virus, by <i>Carmen Gil-Fernández, M.^a Luisa Alonso, A. García-Gancedo and E. Ronda</i>	23
Microorganisms in spoiled margarines. I. Isolation and identification of yeast, by <i>M. Castañón and B. Iñigo</i>	39
Microorganisms in spoiled margarines. II. Isolation and identification of bacteria, by <i>M. Castañón and B. Iñigo</i>	49
National Congress of Microbiology	67
A new biological organization	67

INSTITUTO «JAIME FERRAN, DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS VEGETALES

PRESENCIA DE VIRUS EN NODULOS DE LEGUMINOSAS PRODUCIDOS POR *RHIZOBIUM*

por

AMPARO VELA

INTRODUCCION

Sabida es la gran importancia que tienen las bacterias del género *Rhizobium* por la fijación simbiótica de nitrógeno sobre plantas de la familia Leguminosas, contribuyendo al abonado y fertilidad del suelo.

En este trabajo, teniendo en cuenta la íntima asociación de los nódulos con la raíz de la planta y la existencia de algunos virus de plantas en la raíz, hemos estudiado por cortes ultrafinos la relación virus-bacteria dentro de nódulos huésped de leguminosas producidos por bacterias del género *Rhizobium*, procedentes de plantas de *Phaseolus vulgaris* infectadas por el virus *Phaseolus 2*, para, una vez sabida esta relación, ante la posibilidad de que el ácido nucleico del virus pueda ser incorporado al genoma bacteriano, ver en un estudio posterior si las bacterias pueden transmitir el virus a otras plantas sanas, pues por su simbiosis con la planta, además de la fijación de nitrógeno podrían contribuir a la transmisión de virus, igual que lo hacen algunos hongos parasitarios obligados de plantas.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Hemos utilizado el virus *Phaseolus 2*, procedente de plantaciones de leguminosas de la costa de Málaga, que presentaron en su tejido laminar

el mosaico característico producido por este virus, que pertenece al grupo de los virus de forma de bastoncillo ondulado, de un grosor de menos de 18 m μ y 650 m μ de longitud.

Plantas utilizadas para su estudio

Hemos utilizado plantas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en medio líquido, en una solución nutritiva desprovista de sales nitrogenadas, inoculadas con *Rhizobium phaseolus*, raza 403-2. Las plantas han sido infectadas mecánicamente con el virus *Phaseolus 2*, por frotamiento de la epidermis del tejido laminar con savia de plantas enfermas, usando celite como abrasivo.

Microscopía electrónica

Nódulos enteros de tamaño mediano, procedentes de plantas con síntomas intensos de infección, han sido fijados con tetraóxido de osmio al 2 %, tamponado con acetato de veronal a pH = 6,9, como amortiguador, durante dos horas, a 4 °C; se deshidrataron en acetonas de concentraciones crecientes y se incluyeron en durcupan, endurecidos en estufa durante cuarenta y ocho horas, a 70 °C. Las secciones se realizaron con ultramicrotomo LKB, con cuchillas de vidrio. Los cortes fueron recogidos en alcohol al 10 %, estirados con vapores de cloroformo y montados en rejillas protegidas con una película de formwar. Una vez montados, se tiñeron con una solución de citrato de plomo.

Los cortes estudiados fueron los comprendidos entre 500-600 Å.

El microscopio electrónico empleado ha sido un Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas, de Madrid. La savia de los nódulos triturados fue teñida con ácido fosfotúngstico al 2 % y pH = 7 (1) para la observación de las partículas extraídas de la célula.

RESULTADOS

La ultraestructura de los nódulos de *Rhizobium* la hemos estudiado por secciones ultrafinas.

Hemos podido observar tres tipos de células diferentes: unas presentan grandes zonas ocupadas por vacuolas con poco citoplasma pegado a la

pared celular, conteniendo abundantes ribosomas, dándole un aspecto denso y homogéneo, entre los que se encuentran mitocondrias de aspecto normal, con sus crestas bien desarrolladas, aparato de Golgi y formaciones de virus, distribuidas desordenadamente en el citoplasma, entre estos elementos celulares, muy densas a los electrones, formando agregados muy pequeños y similares a los observados por Weintraub y Ragetli (8) en el tejido laminar de *Vicia faba* infectada con este virus. Aunque la estructura de estas formaciones no se ha podido observar con claridad, por ser muy densas a los electrones, posiblemente estén formadas por partículas flexuosas alargadas, ya que sus dimensiones son semejantes (figura 1).

Otro tipo de células presentan en su citoplasma gran abundancia de formas bacterianas que ocupan la casi totalidad de la célula, dejando entre ellas pequeños espacios citoplásmicos con sus elementos celulares (figura 2) y algunas formaciones densas de virus similares a las observadas anteriormente, diseminadas en el citoplasma que ocupa los pequeños espacios interbacterianos (figuras 3-5).

En el tercer tipo de células podemos observar gran cantidad de retículo endoplásmico muy vesiculizado; a veces estas vesículas se unen formando cadenas, con pocos ribosomas y mitocondrias, de aspecto también normal. En estas células hemos podido ver también las pequeñas formaciones de virus y cuerpos densos semejantes a los denominados esferosomas encontrados en células de tejido laminar infectado por virus (figuras 6-7).

En algunas ocasiones hemos podido ver cómo estas pequeñas formaciones se juntan y forman placas semicristalinas (figura 5).

Las formas bacterianas presentan sus formas típicas de Y y pera —descritas por Dixon (3) y Palacios de Borao (6)—, están rodeadas de una membrana y pared celular y además una unidad de membrana procedente del citoplasma de la célula huésped semejante a la ya observada por Jordán y colaboradores (4) y Dixon (3); podemos ver también cómo entre ésta y la bacteria hay una zona electrónicamente vacía que, ocasionalmente, presenta discontinuidad. La estructura interna de las bacterias es igual que fuera de la célula (figuras 2-5).

Frecuentemente hemos observado bacteroides con su citoplasma muy retraído, envueltos en una matriz zoogleal, semejantes a los descritos por Dart y Mercer (2) y Jordán y colaboradores (4) y que generalmente se encuentran en los espacios intercelulares, pero también los hemos visto dentro del citoplasma, encontrándose en algunas ocasiones junto con ellos bacteroides de aspecto normal. No hemos visto formaciones de virus aso-

ciadas con las formas bacterianas núcleo, nucleolo ni con los elementos celulares como mitocondrias, aparato de Golgi, ya que todos presentaron forma y estructura normales.

DISCUSION

La semejanza que presentan las formaciones de virus vistas en los tres tipos de células descritas, en la ultraestructura de nódulos de *Rhizobium*, con las observadas en el tejido laminar de *Vicia faba*, infectado por el virus *Phaseolus 2*, por Weintraub y Ragetli (8), nos confirma que son formaciones de virus, aunque nosotros no hemos podido verlas en el núcleo y nucleolo como han sido observadas por los autores anteriormente citados. Tampoco hemos podido observar las inclusiones cristalinas descritas por McWhorter (5) y Rich (7) al microscopio óptico. Esto depende posiblemente de la estirpe del virus utilizado.

Los tres tipos de células descritas presentaron formaciones de virus pero fueron más abundantes en las células que no contenían bacterias. Aunque son menos frecuentes y abundantes en las células con formas bacterianas, su presencia parece ser que no interfiere en su desarrollo en número y estructura, ya que éstas presentaron aparentemente igual semejanza que en los nódulos sanos y bacterias fuera de la célula. Las formaciones de virus han sido observadas en los pequeños espacios citoplásmicos interbacterianos, pero en ninguna ocasión las hemos visto en su interior; por lo tanto, parece ser que el virus solamente se reduplica en el citoplasma celular independientemente de las formas bacterianas y elementos celulares, ya que éstos tampoco sufrieron alteración alguna. Aunque pudiera ser que pudiera haber pasado solamente el ácido ribonucleico, y al estar desprovisto de la cubierta proteínica no podría ser observado al microscopio electrónico, siguiendo esta técnica.

RESUMEN

Se ha estudiado la posible asociación del virus *Phaseolus 2* con nódulos inducidos por el *Rhizobium phaseolus*.

Las plantas, crecidas en condiciones estériles, fueron inoculadas con virus *Phaseolus 2* y *Rhizobium phaseolus*, raza 403-2, de nuestro Instituto. Los nódulos jóvenes han sido examinados al microscopio electrónico por secciones ultrafinas y se encontraron bacteroides infectando los teji-



Figura 1. Formaciones de virus (v) en el citoplasma celular. $\times 18.400$

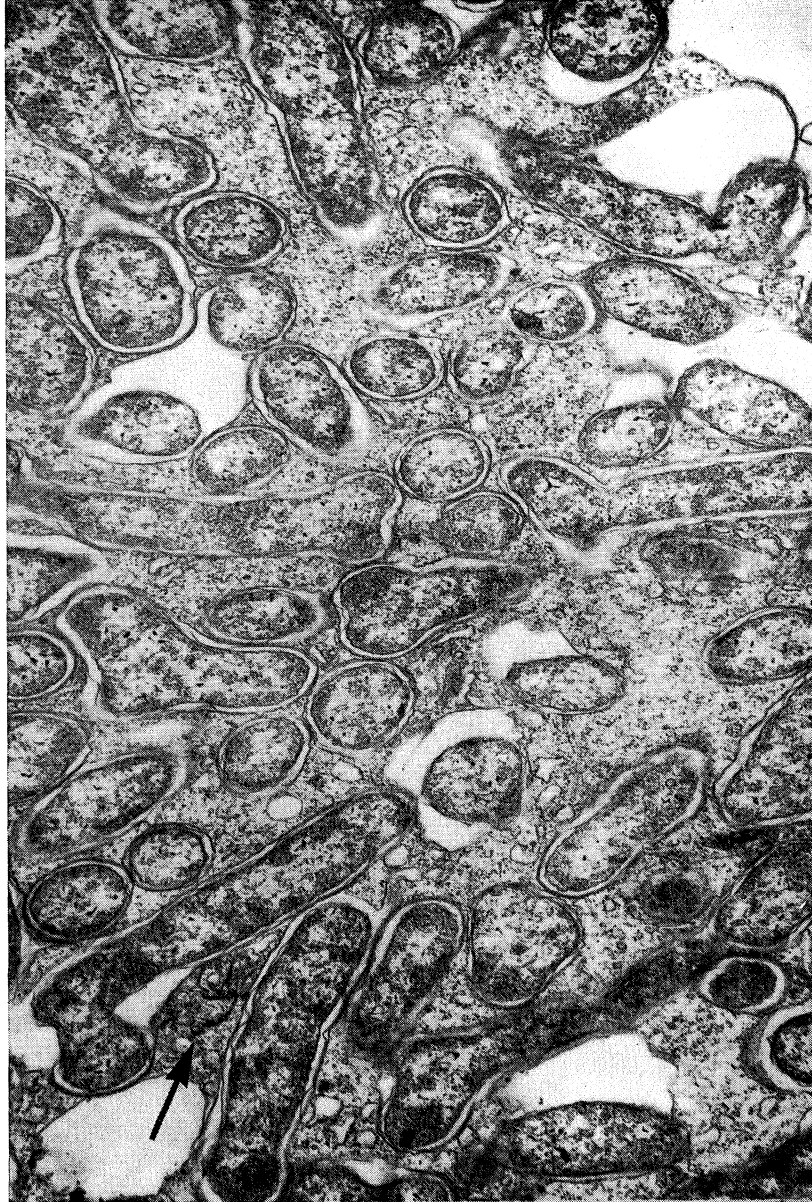


Figura 2. Parte del citoplasma celular con gran abundancia de formas bacterianas y formaciones de virus (v). $\times 18.400$

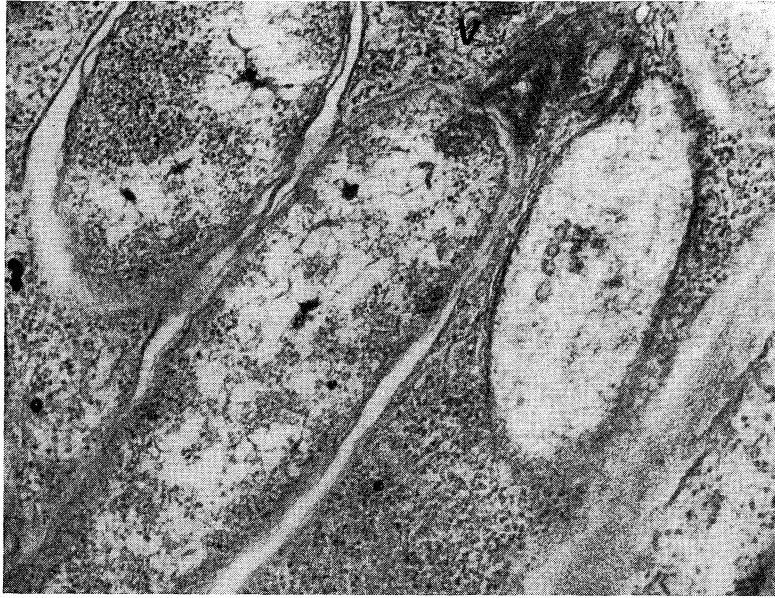


Figura 3. Citoplasma celular con formas bacterianas y formaciones de virus (v). $\times 46.000$



Figura 4. Fotografía similar a la anterior, mostrando también formaciones de virus (v) en el citoplasma celular. $\times 46.000$



Figura 5. Citoplasma celular con formas bacterianas y formaciones de virus (v) unidas, formando una placa semicristalina. $\times 46.000$



Figura 6. Sección ultrafina de nódulo mostrando parte de dos células, la de arriba con formaciones de virus (v). $\times 10.350$

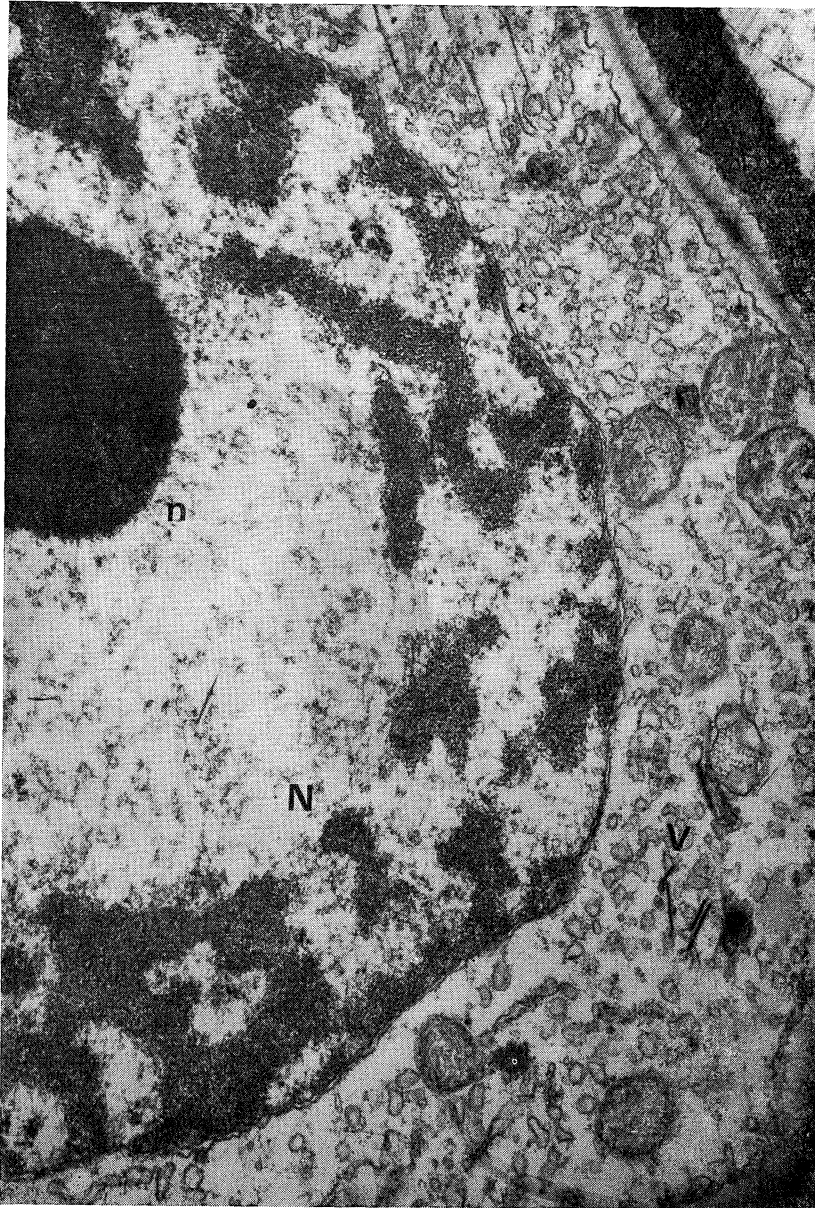


Figura 7. Parte de una célula con formaciones de virus (v) en el citoplasma, núcleo (N) y nucléolo (n). $\times 18.400$

dos. Han sido vistas inclusiones típicas del *Phaseolus 2* en el citoplasma de los tejidos infectados por el *Rhizobium*. No hemos observado inclusiones en los bacteroides. Existe la posibilidad de que el ácido nucleico vírico infecte los bacteroides.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Gregorio Fraile la amabilidad de habernos facilitado el *Rhizobium phaseolus*, raza 403-2.

SUMMARY

Virus infection within Rhizobium induced nodules

In order to study the possible association of bean yellow mosaic virus with the nodule-inducing bacteria *Rhizobium phaseolus*, plants grown under sterile conditions were inoculated with both bean yellow mosaic virus and *Rhizobium phaseolus*, strain 403-2 of our Institute.

Young nodules were examined at the electron microscope by ultrathin sectioning method and bacteroids were found infecting the tissues. In the cytoplasm correspondent to the *Rhizobium* infected tissues typical inclusions of bean yellow mosaic virus were found. No inclusions were found within the bacteroids.

BIBLIOGRAFIA

1. BRENNER, S., y HORNE, R. W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 103-10.
2. DART, P. J., y MERCER, F. V. 1963. Development of the bacteroid in the root nodule of Barrel medie (*Medicago tribuloides* Desv.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) *Arch. Mikrobiol.*, 46, 382-401.
3. DIXON, R. O. 1946. The structure of infection threads, bacteria and bacteroids in pea and clover root nodules. *Arch. Mikrobiol.*, 48, 166-78.
4. JORDAN, D. C.; GRINYER, I., y COULTER, W. H. 1963. Electron microscopy of infection threads and bacteria in young root nodule of *Medicago sativa*. *J. Bacteriol.*, 86, 125-37.
5. MCWHORTER, F. P. 1941. Isometric crystals produced by *Pisum virus 2* and *Phaseolus 2*. *Phytopathology*, 31, 760.
6. PALACIOS-DE BORAIO, G. 1949. Las bacterias simbióticas del nitrógeno bajo el microscopio electrónico. *Microbiol. Españ.*, 2, 51-56.
7. RICH, S. 1949. Some relations between *Phaseolus virus 2* and its associated crystalline inclusions. *Phytopathology*, 39, 221.
8. WEINTRAUB, M., y RAGETLI, H. W. J. 1966. Fine structure of inclusions and organelles in *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic virus. *Virology*, 28, 290.

CLINICA «PUERTA DE HIERRO», DE LA SEGURIDAD SOCIAL. MADRID
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

BETA - LACTAMINE (*) RESISTANT HOSPITAL STAPHYLOCOCCI (**)

by

E. J. PEREA, D. DÁMASO and M. MORENO - LÓPEZ

INTRODUCTION

Since 1961, when Jevons (14) first described the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, these organisms have been studied in greater detail with respect to their resistance to the penicillinase resistant penicillins.

Ayliffe and Barber (1), showed that these strains do produce penicillinase, but not in greater quantities than the methicillin-sensitive ones. In 1964, Sutherland and Rolinson (17) stated that the destruction of methicillin through penicillinase is insufficient for justifying their growth in presence of this type of penicillin.

Barber (2) and Waterworth, in that same year, described the cross resistance of these types of strain to methicillin and cephalosporins.

Baudens et al., in 1965, observed that the penicillinase-negative variants, obtained by treating these staphylococci with acriflavine, were still resistant to methicillin and cephalosporins, thus, their resistance must be due to an intrinsic chromosomal mechanism.

(*) A beta-lactamine is an antibiotic containing a beta-lactam ring in its molecular structure, viz penicillins, cephalosporins.

(**) Communication presented at the II Congreso Nacional de Microbiología. Noviembre, 1969, Madrid.

We consider resistant those strains for which the Minimum Inhibitory Concentration (M. I. C.) is respectively greater than:

12.5	$\mu\text{g/ml}$ for cloxacillin
20	$\mu\text{g/ml}$ for cephalothin
8	$\mu\text{g/ml}$ for cephaloridine

The importance of the clinical significance of these strains has increased in parallel with the above mentioned observations, particularly in the cases of fatal sepsis described by Chabbert et al. (8), in France and in the cases in United States of America of terminal pneumonia.

In England, however, the published cases were accompanied by little information, of clinical significance.

Of the 11 strains isolated, three were pathological clinically, although fortunately they did not inconvenience the patients to a great extent who respectively suffered an abscess, a generalized pyoderma and an infection in a surgical wound.

In the last twelve months we have isolated, in the Hospital Epidemiology and Microbiology Service of the Puerta de Hierro Clinic, 652 strains of coagulase-positive staphylococci, 14 of which (that is 2.1 %) were cloxacillin-resistant. Eleven of these strains were isolated within 5 weeks, which leads us to think of a possible epidemic outbreak. This assumption is the prime reason for this investigation.

MATERIAL AND METHODS

1) Isolation: The primary isolation of the strains was on enriched agar-blood plates.

2) Determination of the production of extracellular coagulase: this was determined by streak inoculation of an isolated colony on a base medium for coagulase (bacto-coagulase agar base Difco), to which 10 % of sterile human plasma had been added. After an incubation period of 18-24 hours at 37 °C the assesment was made, it was considered that the strain had fermented mannitol and coagulated plasma, if, around the streak, a yellow zone appears and the medium turns opaque.

3) Determination of qualitative antibiotic sensitivity: this was by the method of diffusion in solid medium (plate-dish). The dishes employed were loaded as follows:

Tetracyclin	10 μg
Neomycin	30 "
Chloramphenicol	10 "
Streptomycin	5 "
Lincomycin	2 "
Cephalothin	30 "
Cephaloridine	30 "
Erythromycin	5 "
Cloxacillin	5 "
Oleandomycin	5 "
Kanamycin	30 "
Aminosidine	30 "
Gentamycin	5 "

4) Determination of penicillinase production: we employed Gost's test (satellitism) with *Sarcina lutea* ATCC 9341.

5) Determination of Minimum Inhibitory Concentration for the antibiotics cloxacillin, cephalothin and cephaloridine. We followed the method proposed by Chabbert, that is, dilution of the antibiotic in a dish. The concentrations of antibiotic ranged between 0.125 and 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$, diluted in Mueller-Hinton agar.

6) Determination of heterogeneity of the strains: the determination was made by Barber's method in agar tripticase soya medium with 5 % NaCl. We employed discs and dishes with 1 and 5 μg cloxacillin, 30 μg cephalothin and 30 μg cephaloridine. The results were evaluated after an incubation period of 48 hours at 37 °C.

7) Lysotyping: this method was carried out on all strains with the 23 phage-types, following the technique of Williams and Blair, and the directives of the International Subcommittee on Staphylococci Lysotyping.

8) Serotyping: we employed Pillet's technique, using sera nos. I, II, III, 14 and 18. Some of the strains were sent to Dr. Pillet at the Pasteur

Institute, who kindly agreed to serotype them with sera nos. 6, 7, 9, 10, 11, 15, 16, 17 and also with the five previously mentioned sera nos. I, II, III, 14 and 18.

RESULTS

Culture characteristics: all the strains gave small, slow growing colonies without producing pigmentation and without lustre; according to Chabbert, they are defective mutants with respiratory system deficiencies. Seven of the strains haemolized horse-blood in the plate.

Antibiotype: all 11 strains were streptomycin-resistant; 10 were resistant to chloramphenicol, 8 to tetracyclin, 8 to erythromycin, 7 of these had dissociated resistance to the rest of the macrolids—and 5 to ampicillin.

Coagulase production: all 11 strains were coagulase producers and fermenting mannitol.

Penicillinase production: all 11 strains were penicillinase-producers.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration for cloxacillin, cephalothin and cephaloridine

Strain no.	M. I. C. in $\mu\text{g/ml}$		
	Cloxacillin	Cephalothin	Cephaloridine
1	> 128	16	8
2	> 128	32	8
3	> 128	16	2
4	> 128	32	8
5	> 128	64	8
6	> 128	32	8
7	128	16	8
8	8	1	1
9	8	1	1
10	> 128	16	8
11	> 128	32	8

Hemogenicity of the strains: the results obtained on TSA Plates with 5 % NaCl and without NaCl did not present significant differences, thus showing that the strains were not heterogeneously resistant.

Lysotyping: None of the strains were phage-typable with any of the 23 phage-types, using R. T. D. and 1,000 R. T. D. in succession.

Serotyping: Dr. Pillet (16) found no serotyping strain among those sent to him. We did not find any of these 11 strains serotypable.

EPIDEMIOLOGY

The first cloxacillin-resistant strain was isolated in one of the agar-blood plates used for periodical control of the air contamination in the Surgical Department in the Recovery Zone. The second isolation took place four days later, in the control of a nasal exudate of an in-patient on the second floor. This patient had been an in-patient for one month with a neurological problem, and developed a *Staphylococcus* abscess, which was treated with cloxacillin and later with cephalixin. Two new strains were isolated a fortnight later, on pre-operative pubic and nasal samples of two patients occupying neighbouring rooms on the first floor. These two patients, although not treated with beta-lactamines had been in-patients for approximately one month before the taking of the samples, for pre-operative study.

Four days later, and on the fourth floor, a new resistant strain was isolated in a gluteal abscess of a female rheumatological patient, admitted two weeks previously. A new strain was isolated in the same patient, on the following day, in a perineal sample. This new strain varied slightly in its antibiotype from the one isolated in the gluteal abscess the previous day.

The seventh strain was isolated a few days later, in an infected surgical wound. The patient had been admitted two weeks before, and had been treated with ampicillin. On the same day, strains nos. 8 and 9 were isolated in a control survey of the recovery ward in the nasal exudate of one of the nurses assigned to that area. Although these two strains present slight variation in the antibiotype, we feel sure (as the sero and lysotyping failed to clarify the situation) that they are both the same strain, basing this on their Minimum Inhibitory Concentrations for beta-lactamases.

A week later, a new strain caused a generalized pyoderma in one of the female patients in the recovery ward, who had not been treated previously with beta-lactamines. And on the following day we isolated the last of the eleven strains in the nasal exudate of a patient on the first floor.

CONCLUSIONS

During the last year, we have isolated 14 strains of cloxacillin-resistant staphylococci, representing 2.1 % of the total of coagulase-positive staphylococci isolated in our monitoring system. Other authors have obtained percentages ranging from 0.97 % (England, 1964), through to 2.2 % (Turkey, isolated by Cetin), to 12.19 % reported by Chabbert in the period of 1961-64, although his last report referred to isolation on highly selected strains.

Barret et al. (3), have observed that, except for one single case in the 18 they reported, the M. I. C. for cephaloridine was higher than that for cephalothin, and in the other seventeen case the M. I. C. for cephaloridine was equal or lower than that of cephalothin. Our own observations, which agree with those of Hewitt and Parker (13) show that the M. I. C. for cephaloridine is in all cases lower than that for cephalothin.

All these strains were penicillinase producers, and behaved the same in medium with 5 % NaCl. We can thus state that they are penicillinase producing defective mutants, with homogeneous intrinsic resistance (Chabbert).

Following Chabbert's classification for beta-lactamase resistant staphylococci, we find that two of the strains (nos. 7 and 9) are R. B. mutants, as they present a low resistance, they are probably first-step mutants, and their effectiveness clinically is still only potential. The rest of the strains are R. O. mutants, for the following three reasons: a) very high M. I. C. for cloxacillin, b) homogeneously expressed resistance in the culture medium with 5 % NaCl, c) remarkably higher resistance to cloxacillin than to cephalosporins; thus no cross-resistance exists.

We have found that none of the isolated strains were lysotypable. Barret et al. (3), found only one lysotypable strain among the 22 described. Other authors have isolated strains of which a part could be lysed by phages of group III.

Table 2

Strain no.	Date	Origin of sample	Cloxacillin M. I. C.	Cephalothin μg/ml	Cephaloridine	Antibiotype
1	4-IV	Ambiental control recovery zone, 3rd floor	> 128	16	8	S, CAF, E
2	8-IV	Nasal exudate control, room 18, 2nd floor	> 128	32	8	T, CAF, S
3	23-IV	Pre-operative nasal exudate, room 81, 1st floor	> 128	16	2	T, CAF, S, E, A
4	23-IV	Pre-operative pubic exudate, room 78, 1st floor	> 128	32	8	T, CAF, S, E, A
5	26-IV	Pus gluteal abscess, room 40, 4th floor	> 128	64	8	T, CAF, S, L, E, O
6	27-IV	Perineal exudate control, room 40, 4th floor	> 128	32	8	T, N, CAF, S, E, K, A
7	30-IV	Surgical wound exudate, room 56, 1st floor	128	16	8	T, CAF, S, E, A
8	30-IV	Ambiental control recovery zone, 3rd floor	8	1	1	T, N, S, A
9	30-IV	Nasal exudate control (nurse), recovery zone, 3rd floor	8	1	1	S, CAF, E
10	6-V	Pus, dermic lesions recovery zone, 3rd floor	> 128	16	8	S, CAF, E
11	7-V	Nasal exudate control, room 82, 1st floor	> 128	32	8	CAF, S, E

A = Aminosidine. CAF = Chloranphenicol. E = Erythromycin. K = Kanamycin. L = Lincomycin. N = Neomycin. S = Streptomycin. T = Tetracyclin.

As opposed to the results of Chabbert and Pillet (9), who report that their strains were serotypable with sera nos. I, III and 18, and mostly to the latter, none of our strains could be serotyped.

It is our belief that the appearance of these strains is caused by the selection that occurs by the exclusive use, in this Hospital, of cloxacillin in infections caused by penicillinase-producing staphylococci. All the patients in whom these strains were isolated had been admitted to the Hospital at least a fortnight prior to the isolation, which leads us to presume that the strains were of Hospital origin.

Following the antibiotic restriction policy practiced at this Hospital, the use of cloxacillin on staphylococcal infections was suspended for sixty days, and during this period substituted by a combination of fusidic acid and penicillin. For three months following this action, no new strain of resistant staphylococci was isolated.

Our conclusions, in agreement with those of Turner and Cox (18) are that, fortunately these cloxacillin-resistant strains do not appear as frequently as the penicillin and tetracyclin-resistant ones, but they do confirm the necessity for continued epidemiological surveillance, in order to prevent the appearance and spread of these staphylococcal strains, thus also preventing them from becoming endemic at the Hospital.

SUMMARY

A small hospitalary epidemic outbreak of beta-lactamine-resistant staphylococci is described.

The detailed study of these strains shows them to be penicillinase-producing staphylococci with non-heterogeneous resistance; their M. I. C. against anti-penicillinase penicillins was found to be very high, and, within the field of cephalosporines higher for cephaloridine than for cephalothin. No strain could be identified by lysotyping or serotyping.

The apparition of these strains is thought to be due to the selective pressure of the use of cloxacillin on staphylococcal infections in our Hospital, as the temporary replacement of this antibiotic by others (following our antibiotic restriction policy) had the effect of no further apparition of this type of strain in successive time.

RESUMEN

Estafilococos hospitalarios resistentes a las beta-lactaminas

Se describe un pequeño brote epidémico hospitalario de estafilococos resistentes a las beta-lactaminas.

El estudio detallado de estas cepas pone de manifiesto que son estafilococos productores de penicilinas, con resistencia no heterogénea; siendo su C. M. I. frente a las penicilinas anti-penicilinas muy alta y dentro de las cefalosporinas más alta a la cefaloridina que a la cefalotina. Ninguna cepa pudo ser identificada mediante lisotipia ni serotipia.

Se cree que la aparición de estas cepas es debida a la presión selectiva del uso de cloxacilina en las infecciones estafilocócicas de nuestro Hospital, ya que la sustitución temporal de este antibiótico por otros (en virtud de la política de restricción de antibióticos) hizo que no volviera a aparecer este tipo de cepas en lo sucesivo.

BIBLIOGRAPHY

1. AYLIFFE, G. A., and BARBER, M. 1963. *Brit. Med. J.*, II, 202.
2. BARBER, M. 1964. *J. Gen. Microbiol.*, 35, 183.
3. BARRET, F.; MCGEHEE, R. F., and FINLAND, M. 1968. *New England J. Med.*, 279, 441.
4. BLAIR, J. E., and WILLIAMS, R. E. O. 1961. *Bull. OMS*, 24, 771.
5. BULGER, R. J. 1967. *Ann. Intern. Med.*, 61, 81.
6. CETIN, E. T., and ANG, O. 1962. *New Istanbul Contrib. Clin. Sci.*, 5, 317.
7. CHABBERT, Y. A. 1970. *Les antibiotiques en Bacteriologie Medicale*. Paris.
8. CHABBERT, Y. A., et al. 1965. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, 10, 495.
9. CHABBERT, Y. A., and PILLET, J. 1967. *Nature*, 213, 1137.
10. CHURCHER, G. M. 1968. *J. Clin. Pathol.*, 21, 213.
11. DYKE, K. J.; JEVONS, M. P., and PARKER, M. T. 1966. *Lancet*, 1, 836.
12. GOTS. In Y. A. CHABBERT. 1963. *L'Antibiogramme*. Editions de la Tourelle, Paris.
13. HEWITT, J. H., and PARKER, M. T. 1968. *J. Clin. Pathol.*, 21, 75.
14. JEVONS, M. P. 1961. *Brit. Med. J.*, 1, 124.
15. MORENO-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ-COBACHO, A.; DÁMASO, D.; PEREA, E. J., and SANTOS, M. 1968. *Primer Simposio Internacional sobre Antibióticos y Medicina Hospitalaria*. Clínica Puerta de Hierro. Madrid.
16. PILLET, J. 1970. Personal communication.
17. SUTHERLAND, R., and ROLINSON, G. N. 1964. *J. Bacteriol.*, 87, 887.
18. TURNER, G. C., and COX, P. E. 1967. *J. Clin. Pathol.*, 2, 870.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA
SECCION DE VIRUS ANIMALES

HEMADSORCION INESPECIFICA Y ESPECIFICA SOBRE CELULAS DE RIÑON DE CERDO NORMALES E INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (*)

por

CARMEN GIL - FERNÁNDEZ, M.^a LUISA ALONSO, A. GARCÍA - GANCEDO
y E. RONDA

INTRODUCCION

Nos proponemos en este estudio dar cuenta de nuestros trabajos encaminados a estudiar la posibilidad del empleo de cultivos primarios de células de riñón de cerdo, o líneas celulares del mismo origen, para la identificación del virus de la peste porcina africana (PPA). Nos hemos basado en la prueba de la hemadsorción sobre leucocitos de sangre periférica de cerdo, desarrollada por Malmquist y Hay (7) y modificada después por Hess y De Tray (4).

Esta técnica viene empleándose en España como prueba discriminadora entre la PPA y la peste porcina clásica por Sánchez-Botija (10). Este autor utiliza cultivos de leucocitos y como medio de mantenimiento el suero del mismo animal, del que obtiene al mismo tiempo los hematíes empleados en la prueba de la hemadsorción. El autor da gran importan-

(*) Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación subvencionado por el Primer Plan de Desarrollo Económico.

cia a que los leucocitos, el suero y los hematíes procedan todos del mismo animal.

Korn (5) realizó experimentos dirigidos a determinar la especificidad de esta técnica, pero no la consideró válida por aparecer el fenómeno de manera espontánea en los cultivos de leucocitos sin infectar. Sánchez-Botija ya había señalado en el mencionado trabajo (10) esta inespecificidad, que atribuye al empleo de suero que no procede del mismo animal donante de los leucocitos y hematíes.

Drager y colaboradores (2) realizaron otra serie de pruebas en las que observaron que el fenómeno de la hemadsorción no sólo se presenta en los cultivos de leucocitos infectados con el virus de la PPA y de la peste porcina clásica, sino que se observa en los controles no infectados, si bien la hemadsorción con el primer virus es más acentuada.

En el presente trabajo hemos tratado de determinar si el fenómeno de la hemadsorción es específico en las células de riñón de cerdo infectadas con virus de la PPA, y si tiene lugar con hematíes de distintas especies animales y sobre otros tipos de células.

MATERIAL Y TECNICAS

Cultivos celulares de células de riñón de cerdo

1) Células de primocultivo

Se obtienen células de riñón de cerdo mediante la tripsinización de estos órganos procedentes de cerdos, de edad comprendida entre dos semanas y tres meses. Una vez extraídos los riñones del animal, se colocan en solución de Hanks con penicilina y estreptomycinina durante media hora, e inmediatamente después se procede a separar las cápsulas adiposa y conjuntiva. El cortex del riñón se trocea lo más finamente posible y a los fragmentos de tejido se les añade tripsina al 0,5 % y se les somete a agitación por medio de un agitador magnético a la temperatura de 37 °C durante diez minutos. A continuación se retira el sobrenadante, que constituye la primera toma, que se descarta. Se hacen recogidas sucesivas del sobrenadante a intervalos de veinte minutos hasta que el material se ha agotado, manteniendo las células de cada recogida en suspensión en la tripsina a 4 °C, hasta que se ha recogido la totalidad. Después se centrifuga bajo refrigeración (4 °C), durante cinco minutos, a 1.000 r/m, se

descarta el sobrenadante y se lavan las células dos veces con solución de Hanks, centrifugándose cada vez y descartando el sobrenadante. Después de los dos lavados se filtran las células a través de gasa para separar los fragmentos groseros y se vuelven a centrifugar, utilizando esta vez tubos graduados. Se añaden 150 ml de medio de multiplicación/ml de células en paquete, y a partir de esta suspensión y una vez homogeneizada se distribuyen a razón de 200.000 células/tubo de ensayo.

2) *Cepas de células establecidas en cultivo*

Se han utilizado dos cepas de riñón de cerdo establecidas en cultivo en nuestro laboratorio que hemos denominado cepa "Ferrán" y GM. Para su utilización en los diversos experimentos, previo doble lavado con solución de Hanks, las células se tripsinizan con tripsina de 0,25 %, dejándola actuar durante dos o tres minutos, las células en suspensión se distribuyen en tubos a razón de 300.000/tubo.

Todos los tipos de células han sido utilizados cuando se había formado una monocapa celular continua fija en la pared del vidrio.

Medios de cultivo

El medio de multiplicación para las células se compone de: 80 % de solución de Hanks; 10 % de hidrolizado de lactoalbúmina al 5 %; 10 % de suero de ternera; 0,2 % de extracto de levadura; 1 % de rojo de fenol; además se añaden como antibióticos, penicilina, 100 UI/ml; estreptomicina, 100 μ g/ml y nistatina, 20 UI/ml.

El medio de mantenimiento utilizado tiene la misma composición que el anterior, diferenciándose en la cantidad de suero de ternera que se reduce al 5 %, completándose la diferencia con 5 % de solución de Hanks.

Hematíes

Los hematíes de cerdo se obtienen del mismo animal donante de los riñones, al cual se sacrifica por sangría a muerte mediante punción cardíaca. Los hematíes de cobayo, conejo y pollo se obtienen también por punción cardíaca. Una vez extraída la sangre del animal, se mezcla a partes iguales en solución de Alsevers y se centrifuga, para separar los hematíes, que después se lavan con distintas soluciones en las que finalmente se resuspenden al 0,4 %. Las soluciones empleadas han sido: solu-

ción salina, PBS, citrato sódico al 0,72 %, solución de Hanks y tampón de veronal.

Técnicas de la hemadsorción

A las células de riñón de cerdo cultivadas en tubos, se les añade a diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días), después de la inoculación con el virus y como se indica en cada experimento, 0,4 ml de una suspensión de eritrocitos al 0,4 %. Previamente se ha realizado un doble lavado de los cultivos con el mismo diluyente utilizado para los hematíes en cada ensayo.

Se incuban los cultivos a 37 °C y la lectura se lleva a cabo generalmente treinta minutos después de añadir los hematíes. En algunos experimentos se hicieron lecturas a los 10, 20 y 30 minutos y 24 horas. Por cada lectura se toman dos o cuatro tubos, de los cuales se descartan los hematíes no adsorbidos, se lavan y se colocan en posición invertida para realizar la lectura, es decir, colocando la zona donde están fijadas las células en la proximidad del objetivo del microscopio.

Los diferentes grados de hemadsorción se señalan por una escala numérica desde 0 si no existe hemadsorción; \pm cuando se observa el fenómeno en alguna célula aislada, y 1, 2 y 3 que corresponden a grados crecientes de hemadsorción, de los cuales el 3 indica que todas las células están prácticamente cubiertas o rodeadas por los hematíes.

Virus

El virus de la PPA amablemente cedido por el Dr. Sánchez-Botija procede de bazo de cerdo infectado, suspendido en solución de Hanks al 1/20 y parcialmente purificado por centrifugación. El título del virus determinado por hemadsorción es de 10^6 unidades hemadsorbentes.

RESULTADOS

Hemadsorción sobre células normales

Primeramente se han realizado experimentos encaminados a determinar la posible existencia de hemadsorción en cultivos no infectados por virus. Como puede observarse en el *cuadro 1*, la hemadsorción inespecífica es más intensa cuando se emplea PBS (*figura 1*) como diluyente de los hematíes, dando resultados positivos, tanto los procedentes de cerdo

descarta el sobrenadante y se lavan las células dos veces con solución de Hanks, centrifugándose cada vez y descartando el sobrenadante. Después de los dos lavados se filtran las células a través de gasa para separar los fragmentos groseros y se vuelven a centrifugar, utilizando esta vez tubos graduados. Se añaden 150 ml de medio de multiplicación/ml de células en paquete, y a partir de esta suspensión y una vez homogeneizada se distribuyen a razón de 200.000 células/tubo de ensayo.

2) Cepas de células establecidas en cultivo

Se han utilizado dos cepas de riñón de cerdo establecidas en cultivo en nuestro laboratorio que hemos denominado cepa "Ferrán" y GM. Para su utilización en los diversos experimentos, previo doble lavado con solución de Hanks, las células se tripsinizan con tripsina de 0,25 %, dejándola actuar durante dos o tres minutos, las células en suspensión se distribuyen en tubos a razón de 300.000/tubo.

Todos los tipos de células han sido utilizados cuando se había formado una monocapa celular continua fija en la pared del vidrio.

Medios de cultivo

El medio de multiplicación para las células se compone de: 80 % de solución de Hanks; 10 % de hidrolizado de lactoalbúmina al 5 %; 10 % de suero de ternera; 0,2 % de extracto de levadura; 1 % de rojo de fenol; además se añaden como antibióticos, penicilina, 100 UI/ml; estreptomina, 100 μ g/ml y nistatina, 20 UI/ml.

El medio de mantenimiento utilizado tiene la misma composición que el anterior, diferenciándose en la cantidad de suero de ternera que se reduce al 5 %, completándose la diferencia con 5 % de solución de Hanks.

Hematíes

Los hematíes de cerdo se obtienen del mismo animal donante de los riñones, al cual se sacrifica por sangría a muerte mediante punción cardíaca. Los hematíes de cobayo, conejo y pollo se obtienen también por punción cardíaca. Una vez extraída la sangre del animal, se mezcla a partes iguales en solución de Alsevers y se centrifuga, para separar los hematíes, que después se lavan con distintas soluciones en las que finalmente se resuspenden al 0,4 %. Las soluciones empleadas han sido: solu-

como los de cobayo y de conejo. Cuando los hematíes se diluyen en solución salina, también existe hemadsorción inespecífica, pero en menor grado y aún menos cuando se suspenden en la solución de citrato con lo cual la prueba ha sido positiva en un solo experimento con hematíes de cerdo, siendo negativa en los demás tipos de hematíes.

También queremos hacer resaltar que, como se puede ver en el cuadro, a los diez minutos no aparece el fenómeno en ningún cultivo con todos los diluyentes empleados, pero a los veinte minutos hay ligera hemadsorción aumentando su grado a intervalos mayores.

Hemadsorción sobre células infectadas

1) Influencia del diluyente de los hematíes sobre la hemadsorción

Se han realizado varios experimentos sucesivos utilizando diferentes tipos de diluyentes de los hematíes y estudiando la hemadsorción en los cultivos inoculados con virus de la PPA, controlándose la especificidad de la misma por comparación con los testigos sin inocular (*cuadro 2*).

Cuadro 2. Influencia del diluyente de los hematíes sobre la hemadsorción en células de primocultivo de riñón de cerdo

PBS		Solución salina		Citrato		Hanks		Alsever		Veronal	
Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.
3	2	3	1	2	±	3	2	2	1	0	0

Inoc. = cultivos inoculados con PPA. Contr. = cultivos sin inocular con PPA.

La lectura se realiza treinta minutos después de agregar los hematíes. En el cuadro se presentan los valores medios de tres experimentos.

Los diluyentes estudiados han sido los siguientes: PBS, solución salina, solución de Hanks, tampón de veronal y soluciones de Alsevers y citrato. De todas estas soluciones empleadas como diluyentes de los hematíes, la solución de citrato y solución salina (*figura 2*) son las que inducen menos hemadsorción inespecífica, siendo por el contrario el PBS y la solución de Hanks —ambas soluciones tamponadas con fosfatos—

las que dan lugar en mayor escala a la hemadsorción inespecífica. Los hematíes utilizados en este experimento son de cerdo.

A la vista de los resultados que se exponen en el *cuadro 2*, que son el resumen de tres experimentos, podemos decir que se ha observado hemadsorción inespecífica en casi todos los experimentos, si bien la hemadsorción específica, cuando existe, es más marcada en los cultivos infectados que en los controles.

2) Influencia del tiempo de conservación de los hematíes en la hemadsorción

Hemos estudiado la posible influencia que sobre el fenómeno de la hemadsorción pudiera tener el tiempo que permanecen los hematíes de cerdo conservados en nevera a 4 °C.

Como podemos ver en el *cuadro 3*, que resume cinco experimentos llevados a cabo con hematíes de cerdo recientes y de 6, 7, 13 y 25 días de conservación a 4 °C, la hemadsorción inespecífica aumenta a medida

Cuadro 3. Influencia en la hemadsorción del tiempo de conservación de los hematíes

Tiempo de conservación de los hematíes de cerdo a 4 °C	Intervalo entre la adición de los hematíes y la lectura de los cultivos	Diluyentes de los hematíes			
		PBS		Solución salina	
		Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.
Días	Minutos				
Recientes	30	3	0	3	0
6	30	3	2	3	±
7	30	3	3	3	3
13	30	3	2	2	2
25	30	3	2	2	2

Cada número representa la media de tres cultivos.

que los hematíes se conservan durante más tiempo. Únicamente cuando los hematíes que se diluyen en solución salina y en PBS son recientes y no se han conservado en nevera, no se observa hemadsorción inespecífica, la cual aparece sin embargo en los mismos cultivos a los seis días de añadir los hematíes. La solución salina da mejores resultados como

diluyente de los hematíes en cuanto se refiere a la especificidad del fenómeno cuando los hematíes son de 6 días que el PBS, el cual es prácticamente inespecífico. Con los hematíes conservados 7, 13 y 25 días en nevera, tanto si están en suspensión en PBS como en solución salina, el grado de hemadsorción es igual en las células inoculadas y en los testigos.

3) *Hemadsorción en función del tiempo transcurrido entre la infección de los cultivos y la adición de los hematíes*

Se han realizado cinco experimentos que se resumen en el *cuadro 4*. Los diluyentes de los hematíes fueron: PBS, solución salina, y solución de citrato al 0,72 %. Los hematíes de cerdo siempre se añaden a grupos

Cuadro 4. Hemadsorción en función del tiempo transcurrido después de la infección de los cultivos

Días	Diluyente de los hematíes de cerdo					
	PBS		Solución salina		Citrato	
	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.
1	3	2	0	0	2	0
2	3	2	2	0	2	±
3	2	1	2	±	2	0
4	3	2	2	1	1	0
5	2	2	2	0	0	0

Cada número representa la media de tres cultivos.

de tubos con cultivos de células infectadas, a intervalos que oscilan desde un mínimo de 24 horas a 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días, verificándose la adición de los hematíes cada vez a un grupo diferente. En el caso de los hematíes en suspensión en PBS aparece hemadsorción tanto en las células infectadas como en los controles sin inocular a partir de las 24 horas de intervalo, si bien es más marcada en el primer caso, ocurriendo esto en los experimentos en que los hematíes se han añadido a los intervalos de 1, 2, 3 y 4 días tras la infección de las células. Empleando solución salina como diluyente sólo existe hemadsorción en los cultivos inoculados, a partir del 2.º día después de la infección del cultivo y dando el mismo grado

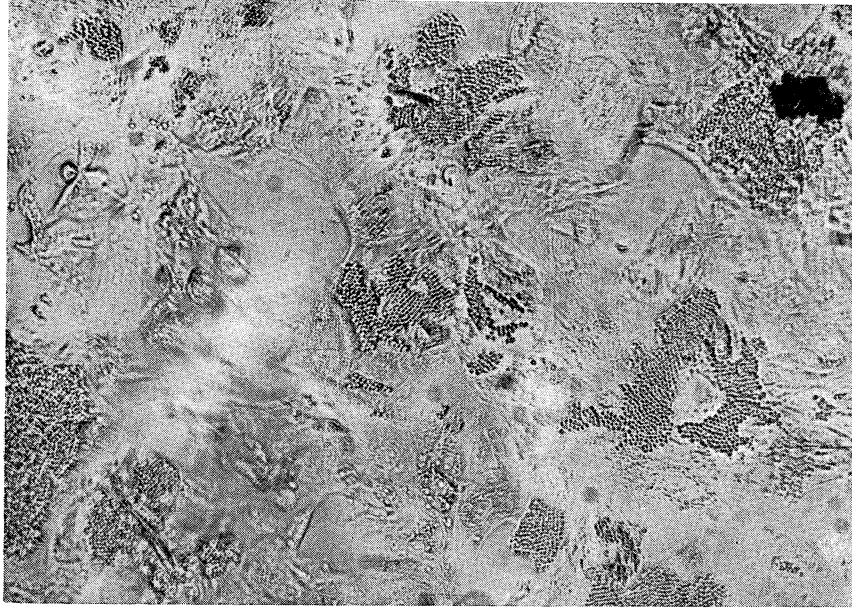


Figura 1. Hemadsorción inespecífica en células de primocultivo de riñón de cerdo. Hematíes de cerdo recientes, en suspensión en solución de PBS

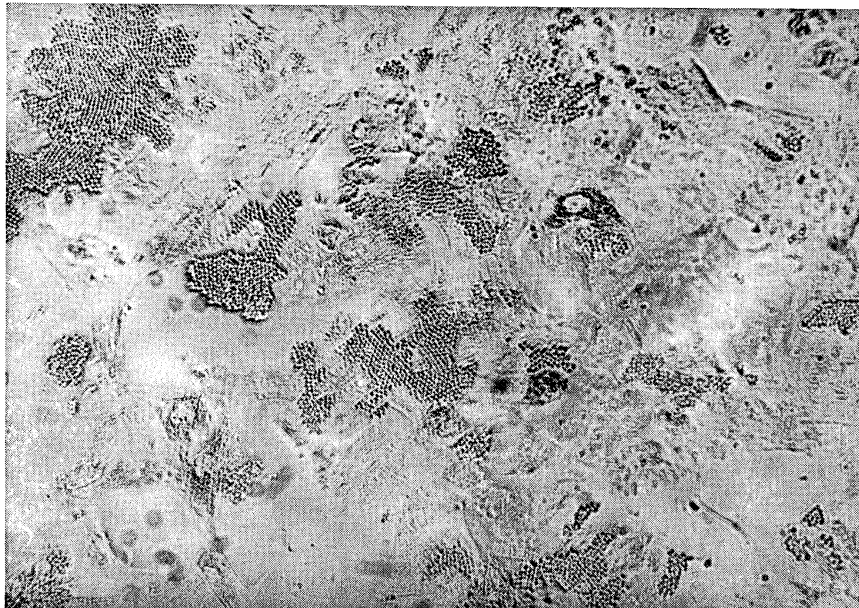


Figura 2. Hemadsorción en células de primocultivo de riñón de cerdo, a las 24 horas de su inoculación con PPA. Hematíes de cerdo recientes, en suspensión en solución salina

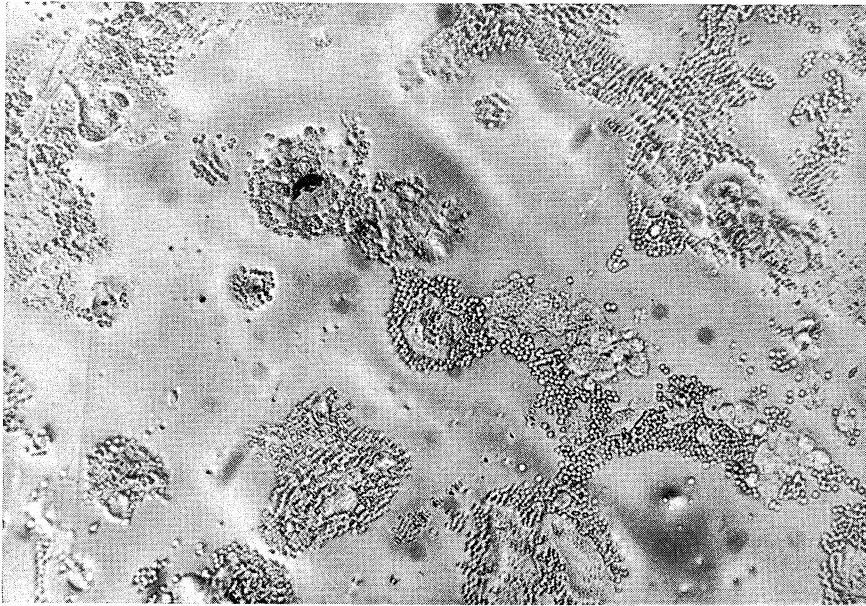


Figura 3. Hemadsorción inespecífica en células GM. Hematíes de cerdo recientes, en suspensión en solución de Hanks

de hemadsorción en los experimentos del 3.º, 4.º y 5.º días. Se observa una ligera hemadsorción inespecífica en los días 3.º y 4.º

Utilizando la solución de citrato para la suspensión de los hematíes, observamos únicamente este fenómeno de inespecificidad en algunas células aisladas al 2.º día. En los cultivos infectados por virus la hemadsorción se observa de los días 1.º al 4.º

4) Hemadsorción en dos cepas de células establecidas de riñón de cerdo

Finalmente hemos realizado pruebas de hemadsorción sobre dos cepas celulares de riñón de cerdo establecidas en nuestro laboratorio.

Estos cultivos mostraban en ocasiones fenómenos de degeneración celular en el transcurso de los diferentes pases. Sospechamos la existencia de virus latentes en las células de riñón de cerdo, cosa muy probable teniendo en cuenta la cantidad de virus latentes que se han encontrado en las células de riñón de mono. En todos los casos en que las células mostraban estos efectos citopáticos sin haber sido inoculadas, se añadieron hematíes de cerdo y pudimos observar hemadsorción más intensa que la obtenida sobre las mismas células cuando son inoculadas por virus de la PPA (*figura 3*).

5) Hemadsorción con hematíes procedentes de diferentes especies animales

Se han llevado a cabo experimentos empleando hematíes, no sólo de cerdo, sino también de cobayo, conejo y pollo. Los resultados obtenidos en tres experimentos se resumen en el *cuadro 5*. Como puede verse, en los ensayos con hematíes de cerdo la hemadsorción es mayor en los cultivos inoculados con virus respecto a los cultivos sin inocular, si bien se presenta en mayor o menor grado según el diluyente empleado, pues la dosis de virus es igual para todos los cultivos. Con tampón de veronal sólo se produce hemadsorción en las células infectadas.

Con los hematíes de cobayo, suspendidos en tampón de veronal y solución salina también se observa mayor grado de hemadsorción en los cultivos inoculados, con respecto a los cultivos sin inocular con los hematíes, no apareciendo hemadsorción en cultivos con los hematíes suspendidos en Hanks, y dando ligera hemadsorción con los hematíes suspendidos en PBS, tanto en los cultivos inoculados como en los controles.

Cuando se utilizan hematíes de conejo existe una ligera hemadsorción

Cuadro 5. Hemadsorción con hematíes procedentes de diferentes especies animales

Hematíes	Diluyente de los hematíes							
	PBS		Solución salina		Hanks		Veronal	
	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.	Inoc.	Contr.
Cerdo	3	1	2	1	3	2	1	0
Cobayo	1	1	2	1	0	0	2	0
Conejo	1	±	2	1	1	0	0	0
Pollo	0	0	0	0	0	0	0	0

Resumen de tres experimentos. La hemadsorción se realiza a las 48 horas después de la inoculación de los cultivos, y la lectura, a los 30 minutos. Edad de los hematíes; hematíes de cobayo, conejo y pollo, recientes; de cerdo, 24 horas.

con los hematíes suspendidos en PBS, Hanks y algo más acusada con los suspendidos en solución salina; con tampón de veronal se obtienen resultados negativos. Con los hematíes de pollo no se obtiene hemadsorción en ningún caso. En los casos de hemadsorción positiva es ligeramente de mayor grado en los cultivos inoculados con respecto a los no inoculados.

DISCUSION

El interés del fenómeno de la hemadsorción se basa en la posibilidad de evidenciar la presencia de virus en las células antes de que se presenten efectos citopáticos en las mismas.

En el caso de la PPA, el fenómeno de la hemadsorción ha tenido además un gran valor en el diagnóstico de la enfermedad, diferenciándola de la peste porcina clásica, desde los trabajos de Malmquist y Hay (7), que observaron este fenómeno en leucocitos de cerdo infectados con PPA, mientras que con el virus de la peste porcina clásica no se produce. Posteriormente, Hess y De Tray (4) y Sánchez Botija (9) simplificaron la técnica y pusieron a punto un método de diagnóstico de la PPA. Este último autor realiza hemadsorción en cultivos de leucocitos, que obtiene de sangre de cerdo desfibrinada y centrifugada, cultivados en suero del mismo animal junto con una pequeña cantidad de eritrocitos, que son los

que se hemadsorben después de la inoculación de los cultivos, sobre los leucocitos infectados.

Malmquist (6) describe la hemadsorción en cultivos celulares de riñón de cerdo infectado con el virus de la PPA, formando los eritrocitos roseatas alrededor de las células infectadas. Este autor no menciona la existencia del fenómeno en forma inespecífica, aunque el lavado de los hematíes lo realiza con PBS y luego conserva los hematíes suspendidos en el medio basal de Eagle, colocándolos en nevera hasta su utilización.

Como hemos visto en el curso de nuestro trabajo, el PBS produce una gran inespecificidad, como asimismo la conservación de los hematíes en nevera. Formas de hemadsorción en roseta, como las que muestran los citados autores, las hemos visto frecuentemente nosotros en las células de riñón de cerdo sin infectar.

Según Malmquist, se ha logrado adaptar la cepa Hinde de PPA a una línea de células de riñón de cerdo PK-2a después de 119 pases en estas células, observando efectos citopáticos en las mismas y hemadsorción, si bien no consigue titular el virus en leucocitos porque la reacción no aparece antes de que el cultivo degenera.

Greig y colaboradores (3) describen la adaptación de seis cepas del virus de la PPA a cultivos de células de primocultivo de riñón de cerdo.

Estos autores señalan que la hemadsorción es menos sensible que la tinción con anticuerpos fluorescentes, pero no mencionan si encuentran hemadsorción inespecífica.

Si bien estos autores no hacen mención de la hemadsorción inespecífica, nosotros, a lo largo de nuestro estudio, la hemos observado continuamente. En el caso de las dos cepas establecidas por nosotros ("Ferrán" y GM), siempre que estas células mostraron aparentar efectos citopáticos sin haber sido inoculadas por virus, se les añadió hematíes de cerdo, observándose hemadsorción en todos los casos. Este hecho nos hace pensar que estas células pudieran hospedar virus latentes, cosa muy posible, si consideramos la cantidad de virus latentes que se han aislado de las células de riñón de mono.

Dowle y Robinson (1) describen dos mecanismos mediante los cuales se puede producir hemadsorción, uno, específico, por el que se unen los eritrocitos con los receptores víricos, y otro, inespecífico, en el que la reacción se lleva a cabo entre eritrocitos parcialmente desnaturalizados o alterados y las células de riñón de mono. Al segundo tipo de hemadsorción

lo denominan tisular y lo encuentran con células de riñón de mono, perro, gato y conejo.

A este tipo de hemadsorción tisular podemos achacar en parte las hemadsorciones inespecíficas encontradas por nosotros, aunque creemos que el fenómeno es más complejo y que además intervienen otros factores, como son, por un lado, la presencia de virus latentes en las células y por otro, las condiciones en que se efectúa la reacción y que hemos enumerado en la parte experimental.

Neuman y Tytell (8) señalan que la hemadsorción inespecífica está relacionada con la concentración de iones Ca. Estamos de acuerdo con estos autores en que la hemadsorción es favorecida por la presencia de iones Ca y quizá sea ésta la explicación de que nuestros resultados más inespecíficos los hayamos encontrado cuando los hematíes estaban suspendidos en solución de PBS y de Hanks; sin embargo, como hemos visto a lo largo de nuestro trabajo, existen también otros factores importantes que intervienen en el fenómeno.

RESUMEN

Se han realizado estudios sobre el fenómeno de la hemadsorción en células procedentes de riñón de cerdo (de primocultivo y dos líneas establecidas, GM y "Ferrán") infectadas con el virus de la peste porcina africana (PPA) y en las mismas células sin infectar. Se ha encontrado que dicho fenómeno no es absolutamente específico en este tipo de células, apareciendo hemadsorción inespecífica frecuentemente y en dependencia con el intervalo entre la infección del cultivo y la adición de los hematíes, el período de conservación de éstos, la especie animal de que proceden y la naturaleza del medio en que están en suspensión dichos hematíes.

Las condiciones más favorables para obtener una hemadsorción lo más específica posible son: utilizar hematíes de cerdo recién obtenidos sin haber sido conservados a 4 °C, hacer la suspensión de los mismos en solución salina o de citrato, añadirlos a los cultivos, en el caso de la estirpe de virus empleada por nosotros, a los dos o tres días después de la inoculación de las células y realizar la lectura a los treinta minutos de haber sido añadidos.

SUMMARY

Specific and non-specific hemadsorption by pig kidney cells infected and non-infected with the African swine fever virus

The hemadsorption phenomenon onto swine kidney cells of primary origin and two established cell lines (GM and "Ferrán") infected with African swine fever virus (ASFV) and the same cells not infected have been studied.

It is found that the hemadsorption is not completely specific there appearing a non-specific hemadsorption which depends on several factors: time after the cells infection at which the eritrocytes are added, length of time during which they have been stored into the refrigerator, the animal source from which they come from and finally the solution chosen to make up the eritrocytes suspension.

The most favourable conditions in order to avoid the non-specific hemadsorption have been established as follows: (a) Fresh swine eritrocytes which have not been stored must be used. (b) Saline solutions or citrates must be employed to make up the eritrocytes suspension. (c) In the case of the virus seed used in this work, the eritrocytes should be added to the cultures between 2 and 3 days after the cells have been infected and (d) the reading of the results should be carried out 30 minutes afterwards.

BIBLIOGRAFIA

1. DOWDLE, W. R., y ROBINSON, R. Q. 1966. Non-specific hemadsorption by *Rhesus* monkey kidney cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 193-98.
2. DRAGER, K.; KAMPHANS, S., y WIEGAND, D. 1965. Zur Frage der Spezifität des HämadSORPTIONSTESTES bei der afrikanischen Schweinepest. Tierärztl. Umsch., 3, 123-26.
3. GREIG, A. S.; BOULANGER, P., y BANNISTER, G. L. 1967. African swine fever. V. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 31, 24-31.
4. HESS, W. R., y DE TRAY, D. E. 1960. The use of leucocyte cultures for diagnosing African swine fever (ASF). Bull. Epiz. Dis. Afr., 8, 317-20.
5. KORN, G. 1969. Ueber die afrikanische Schweinepest und die Spezifität des HämadSORPTIONSTESTES zu ihrer Diagnose. Monatsh. Tierheilk., 15, 225-32.
6. MALMQUIST, W. A. 1962. Propagation, modification and hemadsorption of African swine fever virus in cell culture. Amer. J. Vet. Res., 29, 241-47.

7. MALMQUIST, W. A., y HAY, D. 1960. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Amer. J. Vet. Res.*, 21, 104-8.
8. NEUMAN, R. E., y TYTELL, A. A. 1965. Anomalous hemadsorption by cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119, 180-86.
9. SÁNCHEZ-BOTIJA, C. 1962. Estudios sobre la peste porcina africana en España. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 58, 707-27.
10. SÁNCHEZ-BOTIJA, C. 1962. Diagnóstico diferencial entre la peste porcina clásica y la peste porcina africana. *C. R. Symp. Int. Virol. Vet. Lyon*, 43-50.
11. SÁNCHEZ-BOTIJA, C. 1963. Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la PPA en los artrópodos mediante la prueba de la hemadsorción. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 60, 895-99.
12. SÁNCHEZ-BOTIJA, C. 1963. Modificación del virus de la peste porcina africana en cultivos celulares. Contribución al conocimiento de la creación patógena del poder de protección de las estirpes atenuadas. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 60, 901-16.

ESTUDIO MICROBIOLOGICO DE MARGARINAS ALTERADAS

I. Aislamiento e identificación de especies: Levaduras

por

M. CASTAÑÓN y B. IÑIGO

INTRODUCCION

La margarina constituye en la actualidad un producto de gran difusión y ocupa un destacado puesto en la alimentación humana.

Su producción y consumo han ido en progresivo aumento en nuestro país y en todo el mundo, como consecuencia del continuo mejoramiento de sus propiedades organolépticas y valor nutritivo, y de su bajo precio; representando alrededor del 15 % del consumo mundial de grasas alimenticias (4).

Durante el almacenamiento, la margarina puede sufrir distintos tipos de alteraciones, de mayor o menor importancia, siendo una de las más frecuentes e interesantes, la de origen microbiano (1), por ocasionar graves pérdidas económicas y complicaciones higiénicas.

Las margarinas afectadas son rechazadas comercialmente, por afectarse su aspecto, sabor y aroma; y resultan inadmisibles desde el punto de vista sanitario, porque los metabolitos resultantes de una serie de desdoblamientos y degradaciones producidas por los microorganismos iniciadores de la alteración, permiten el desarrollo de gran cantidad de gérmenes que en las primitivas condiciones no podían hacerlo (6).

El objeto de este trabajo comprende el aislamiento y clasificación de todas las especies de levaduras presentes en la alteración.

MATERIAL Y METODOS

Muestras analizadas

Partimos de muestras adquiridas en el mercado que presentaban los siguientes síntomas: color amarillo intenso, mal olor y separación de las dos fases del sistema graso polifásico.

Posteriormente, se solicitaron a fabricantes muestras de materias primas y productos terminados de diferentes edades, para determinar el vehículo y momento de la contaminación:

1. Salmueras sin tratar.
2. Salmueras tratadas (filtración esterilizante).
3. Sal.
4. Fécula.
5. Margarinas con sal, alteradas.
6. Margarinas sin sal, buenas condiciones.
7. Margarinas sin sal, alteradas.

La materia grasa: aceites vegetales y fracciones de bajo punto de fusión de grasas de origen animal; y los aditivos: conservadores, antioxidantes, colorantes y enriquecedores vitamínicos, no se analizaron por considerar imposible cualquier actividad biológica en ellos, y por tanto que actúen como vehículos contaminantes.

Aislamiento

Se ha hecho sobre mosto de malta, de 6 °Bé., agarizado al 2 %; por el procedimiento de agotamiento en placa, partiendo de 0,1 cm³ directamente tomado de las muestras líquidas, o de la suspensión resultante de interponer las sólidas en solución fisiológica estéril.

Se incuba a 30 °C.

Obtención de cultivos puros

Se estudian las colonias de las placas con lupa estereoscópica y se basa el criterio de elección en su distinta morfología y el predominio;

de tal forma, que en la colección de cultivos puros obtenida están representadas las diferentes especies, en la proporción en que intervienen en el fenómeno.

Las cepas se conservan sobre el mismo medio que se aislaron.

Estudio taxonómico de cultivos puros

Se efectúa siguiendo las técnicas adoptadas en este Departamento, que son una selección de las recomendadas por Lodder y Krejer van Rij (7) y las realizadas en la escuela italiana de Castelli (3).

Todos los ensayos se realizan a partir de un inóculo de 48 horas.

A) Ensayos morfológicos

Carácter macroscópico de las vegetaciones y microscópico de las células, en medio sólido (agar-malta) y líquido (mosto de malta).

Formación de pseudomicelio, según Rivalier-Seydel (8).

Esporificación, siguiendo la modificación del método de Gorodkova descrita por Lodder y Krejer van Rij (7).

Obtención de colonias gigantes.

B) Ensayos fisiológicos

Fermentación y asimilación de azúcares, según técnica de Capriotti (2).

Asimilación de nitratos, según Capriotti (2).

Asimilación de etanol.

Escisión de glucósidos: arbutina.

Lipólisis de grasas, según método de Verona (9).

Reacción en litmus milk.

Licuefacción de gelatina.

RESULTADOS

Cuadro 1. Aislamiento

Muestra	Cepa	Aspecto de la colonia	Aspecto de la pátina	Aspecto del líquido	Carácter microscópico
1					
2					
3					
4					
5	M5-1	A	L	T	a
	M5-2	A	L	T	a
	M5-3	A	L	T	a
	M5-4	A	L	T	a
	M5-5	A	L	T	a
6					
7	M7-1	A	L	T	a
	M7-5	A	L	T	a
	M7-6	A	L	T	a

A = colonia blanco-amarillenta, opaca, grande, alzada en el centro y con dibujo superficial. L = pátina oscura de borde liso y rizada en la superficie. T = gran sedimento y turbidez. a = células ovales y alargadas de tamaño muy diverso (*figura 1*).

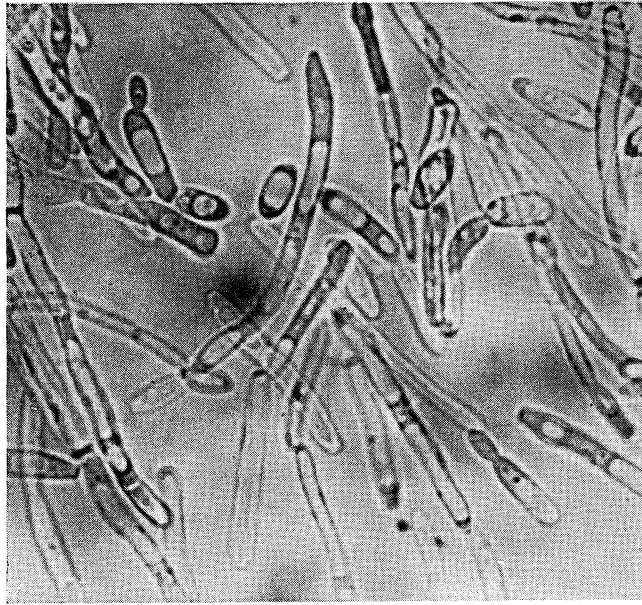


Figura 1. Células de C. lipolytica, observación microscópica

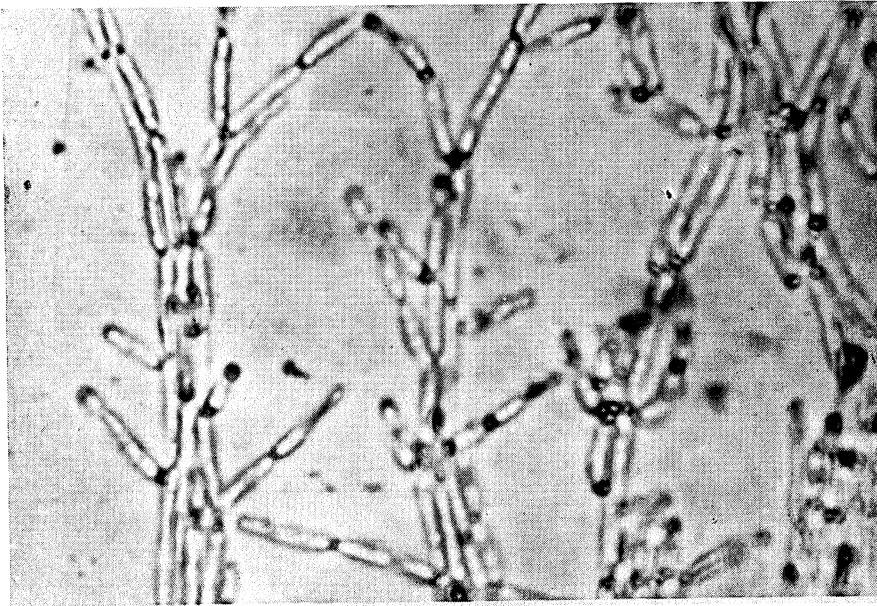


Figura 2. C. lipolytica, pseudomicelio

Cuadro 2. Levaduras

Cepa	Formación de pseudomicelio	Esporificación	Colonias gigantes	Fermentación de						Asimilación de					Hidrólisis de grasas	Escisión de arbutina	Asimilación de nitratos	Desarrollo en etanol	Fluidificación de gelatina	Litmus milk		Diagnóstico
				Glucosa	Galactosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa						Rafinosa	Acción	
Testigo				—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	99	—	—	6,5	
M5-1	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	89	+	Pe	8,3	<i>Candida lipolytica</i>
M5-2	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	88	+	Pe	8,2	<i>C. lipolytica</i>
M5-3	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	86	+	Pe	8,3	<i>C. lipolytica</i>
M5-4	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	89	+	Pe	8,2	<i>C. lipolytica</i>
M5-5	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	87	+	Pe	8,3	<i>C. lipolytica</i>
B5-3	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	86	+	Pe	8,3	<i>C. lipolytica</i>
M7-1	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	88	+	Pe	8,3	<i>C. lipolytica</i>
M7-5	S	—	G	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	89	+	Pe	8,3	<i>C. lipolytica</i>

S = ramificación dicotómica. Largos filamentos con blastosporas ovaladas, dispuestas en verticilos o en pequeñas cadenas terminales (figura 2). G = colonia gigante, opaca, de color blanco pardo, alzada en el centro y rizada en la superficie. Pe = peptonización.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del *cuadro 1* muestran una infección de la margarina, cuyo origen no se halla en las materias primas empleadas, ya que no existen microorganismos en las muestras 1-4.

En las muestras 5 y 7 encontramos una gran población microbiana, en la que están asociadas levaduras con diferentes tipos de bacterias.

El estudio de las características taxonómicas más generales de las cepas de levaduras aisladas muestra una total coincidencia con la descripción de Lodder y Krejer van Rij (7), para el género *Candida*.

Dentro de él encontramos tres especies que no fermentan azúcares, asimilando sólo la glucosa.

El hecho de peptonizar el litmus milk, licuar la gelatina e hidrolizar las grasas, nos conduce a su clasificación como *Candida lipolytica* (5 y 7).

Esta levadura, de origen ambiental, está presente en todas las muestras alteradas. Su actividad lipolítica y el elevado porcentaje en que se encuentra, hacen pensar en ella como iniciador del proceso de degradación biológica.

Por lo que creemos conveniente estudiar cuantitativamente su poder hidrolítico y el papel que los metabolitos resultantes de su actividad vital, así como los de su propia autólisis, puedan tener como substrato nutritivo de las bacterias no lipolíticas que le suceden en la alteración.

RESUMEN

De distintas muestras de margarinas alteradas, se han aislado numerosas cepas de levaduras, completamente homogéneas. Prosiguiéndose con siete el estudio taxonómico.

Los resultados obtenidos han llevado a su identificación como *Candida lipolytica*.

Su constante presencia, predominio y capacidad hidrolítica, inducen a pensar en ella como iniciadora de la degradación y posibilitadora del desarrollo de otros microorganismos.

SUMMARY

Microorganisms in spoiled margarines. I. Isolation and identification of yeasts

From different spoiled margarines have been isolated several homogeneous strains of yeasts.

The cultural and physiological characters of seven of them have been studied. Taxonomic interpretation led up to recognition of strains as *Candida lipolytica*.

Their initial position in degradation is suggested due to the large number which were found in all of the examined samples; as well as changes produced by lipolytic enzymes splitting fats, turned margarine into a suitable substrat for the development of many other different microorganisms.

BIBLIOGRAFIA

1. BUTTIAUX, M. R. 1962. Rev. Fr. Corps Gras, 9, 92.
2. CAPIROTTI, A. 1955. Biochim. Appl., 2, 31.
3. CASTELLI, T., e IÑIGO, B. 1957. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia.
4. FERON, M. R. 1962. Rev. Fr. Corps Gras, 9, 48.
5. GIBBS, B. M., y SHAPTON, D. A. 1968. Identification Methods for Microbiologists (B). Academic Press, Londres y Nueva York.
6. IÑIGO, B., y CASTAÑÓN, M. Agroquímica y Tecnología de Alimentos, en prensa.
7. LODDER, J., y KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1967. The Yeasts. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
8. RIVALIER, E., y SEYDEL, S. 1932. C. R. Soc. Biol., 181.
9. VERONA, O. 1950. Microbiologia delle Fermentazione Industriale. Florencia.

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

ESTUDIO MICROBIOLOGICO DE MARGARINAS ALTERADAS

II. Aislamiento e identificación de especies: Bacterias

por

M. CASTAÑÓN y B. IÑIGO

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (6) se dan los resultados del aislamiento e identificación de levaduras, a partir de margarinas rechazadas comercialmente, durante el período de almacenamiento, por alterarse su aspecto, sabor y aroma.

La observación microscópica de las muestras puso de manifiesto la existencia de gran número de bacterias asociadas a las levaduras.

Esta heterogénea población consta de bacterias y levaduras lipolíticas (2) y de otra serie de microorganismos, que utilizan como substrato nutritivo los metabolitos resultantes de la actividad vital de los anteriores.

A consecuencia de esta sucesión de especies, sobrevienen profundos cambios físicos y físico-químicos en el sistema de fases y sus componentes. Y por otra parte, presenta gran interés industrial, desde el momento que no es posible el desarrollo de unos sin el concurso de los otros, por lo que es suficiente la inhibición de los que inician la degradación para controlar microbiológicamente el producto.

El objeto del trabajo es el aislamiento y clasificación de los microorganismos que intervienen en la alteración.

MATERIAL Y METODOS

Las diferentes muestras y materias primas analizadas, así como las técnicas seguidas para el aislamiento y obtención de cultivos puros, son las mismas que en el trabajo antes citado (6), con la única excepción del medio base utilizado.

Este medio, B, es una modificación del recomendado por Rogosa y colaboradores (14) para la conservación de bacterias lácticas, y ha sido ensayado en otros trabajos (5) con excelentes resultados.

Su composición es como sigue:

Extracto de levadura	5 g
Glucosa	3 g
Lactosa	2 g
Jugo de tomate	75 cm ³
Agar	20 g
Agua destilada	1.000 cm ³

ajustando el pH a 6,5 con solución al 10 % de carbonato sódico y esterilizando a 1/2 atmósfera, durante cuarenta minutos.

Estudio taxonómico de cultivos puros

Todos los ensayos se efectúan a partir de cultivos jóvenes, de 48 horas, incubándose a 30 °C el tiempo conveniente para obtener una respuesta efectiva.

A) Ensayos morfológicos

Carácter macro y microscópico de los cultivos en medio sólido y líquido.

Tinción por el método de Gram. Esta técnica ha sido modificada respecto a la clásica en la siguiente forma: se realiza sobre cubreobjetos y a partir de soluciones madres: de violeta de genciana (2 % en alcohol absoluto) y de eosina (2 % en agua destilada), que se diluyen al 10 % en

el momento de uso, en solución saturada de anilina recién destilada, la primera, y en agua destilada, la segunda.

Las diluciones se filtran, así como el lugol, y se distribuyen en pocillos, donde se introducen los cubreobjetos con la preparación fijada.

Terminada la tinción, el cubreobjetos se une a un portaobjetos con bálsamo de Canadá, manteniéndose la presión con unas pinzas de Cornet. De este modo, las preparaciones quedan muy claras y se pueden conservar indefinidamente.

B) Ensayos fisiológicos

De las pruebas taxonómicas descritas a continuación, sólo unas se practican a la totalidad de las cepas aisladas, sirviendo para caracterizar grandes grupos.

Las restantes son propias de cada uno de los grupos en que previamente las hemos encuadrado.

En general, se siguen las técnicas recomendadas por la Sociedad de Bacteriólogos Americanos (19-20) y Harrigan y McCance (7).

En el caso de seguir a un determinado autor o introducir alguna modificación, lo citamos a continuación.

Efecto de la temperatura y la sal sobre el desarrollo. Se emplea como medio base, el F, ensayado en otros trabajos (5) y con la siguiente composición:

Extracto de levadura	1 g
Extracto de carne	1 g
Glucosa	20 g
Jugo de tomate	75 cm ³
Agua destilada	1.000 cm ³

pH de 6,5, que se ajusta con solución al 10 % de carbonato sódico y se esteriliza a vapor fluente, una hora.

El crecimiento celular a 15° y 45 °C, y con contenidos en cloruro sódico del 4 y 10 %, se mide turbidimétricamente, en fotocolorímetro, a 530 m μ .

Producción de amoníaco a partir de arginina. Según Gibson y Abd-el-Malek (6).

Necesidades en oxígeno. Según Buttiaux y Gagnon (4).

Ensayo de Baird-Parker (1) para la diferenciación entre *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

Utilización de fosfato amónico, como única fuente de nitrógeno. En un medio conteniendo:

Glucosa	20 g
Fosfato monopotásico	10 g
Sulfato magnésico	2 g
Fosfato amónico	15 g
Agua destilada	1.000 cm ³

se hace desarrollar la bacteria, midiendo luego en fotocolorímetro a 630 m μ , el crecimiento.

Metabolismo anaerobio del manitol. Según técnica de Mossel y Martin (12).

Carácter homo u heterofermentativo de las bacterias lácticas. Según método de Gibson y Abd-el-Malek (7).

Naturaleza óptica del ácido láctico producido. Determinación según el método rápido de Barre (2).

Fermentación alcohólica de la glucosa. Al siguiente medio:

Extracto de levadura	10 g
Urea	1 g
Acido tartárico	0,3 g
Agua destilada	1.000 cm ³

se le añaden cantidades crecientes de glucosa, entre un 2 y un 20 %; comprobándose el desprendimiento de CO₂ por pérdida de peso y analizando cuantitativamente el alcohol producido por el método de Semichon y Flanzky (16).

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

No se encuentran bacterias en las muestras procedentes de materias primas (*cuadro 1*), coincidiendo con los resultados obtenidos en el aislamiento de levaduras (6). Mientras que pueden aislarse gran número de ellas en las margarinas deterioradas.

La heterogénea naturaleza de las cepas hace imposible abordar su clasificación en bloque, por lo que es necesario establecer primero grandes grupos, que se estudian por separado.

Con los resultados de las siguientes pruebas preliminares: producción o no de gas en la fermentación de azúcares, catalasa, tipo de acción sobre el litmus milk y tinción por el método de Gram (*cuadro 2*), quedan así agrupadas:

Cocos gram-positivos, catalasopositivos (cuadro 3). La respuesta en el ensayo de Baird-Parker es de *Staphylococcus* en todas las cepas. Pero el comportamiento de ellas es diferente frente a algunos azúcares: manitol, xilosa y trehalosa; producción de fosfatasa, licuefacción de gelatina, reducción de nitratos y acción sobre el litmus milk.

Las cepas que peptonizan la leche son fosfatopositivas y fluidifican la gelatina, presentando además las típicas colonias que con el tiempo evolucionan al naranja y fermentan el manitol; se identifican con el *Staphylococcus aureus* (1 y 3).

Las otras se incluyen en la especie *Staphylococcus epidermidis*, grupo V de Rosenbach (1 y 3).

Bacterias lácticas (cuadro 4). Se trata de un lactobacilo homofermentativo, que acidifica la leche sin llegar a coagularla.

Por las temperaturas de crecimiento, lo podemos situar dentro del antiguo género *Streptobacterium* (13), formado actualmente por dos especies: *Lactobacillus plantarum* y *L. casei* (17).

El hecho de producir ácido láctico ópticamente inactivo y fermentar la melibiosa nos lleva a su clasificación como *Lactobacillus plantarum*.

Bacterias gram-negativas (cuadro 5). Por fermentar los azúcares con producción de gas se pensó que pertenecían al grupo *coli-aerogenes*; pero en contra de esta hipótesis tenemos el hecho de que alcalinizan la leche (3). Esto mismo impide su encuadramiento en el género *Aeromonas*.

Dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Xantomonas*, frecuentes en margarinas infectadas (11), no podemos tampoco incluirlas, por la vigorosa fermentación que nuestras cepas producen frente a varios azúcares.

Cuadro 1. Aislamiento

Muestra	Cepa	Aspecto de la colonia	Aspecto de la pátina	Aspecto del líquido	Carácter microscópico
1					
2					
3					
4					
5	B5-1	B	B ₁	A	c
	B5-2	N	N ₁	A	C
	B5-4	B	B ₁	A	c
	B5-5	N	N ₁	A	C
6					
7	M7-2	M	P	T	b
	M7-3	M	P	T	b
	M7-4	M	P	T	b
	B7-1	M	P	T	b
	B7-2	M	P	T	b
	B7-3	O	D	F	l
	B7-4	M	P	T	b
	B7-5	M	P	T	b
	B7-6	O	D	F	l

B = colonia lisa, circular, blanca, brillante y opaca. N = colonia circular, de caracteres similares a la B, pero que son blancas los primeros días y luego pasan a naranja. M = colonia blanca, lisa, brillante, mucosa y filante al efectuar la toma. O = colonia lisa, circular, opaca y blanca.

B₁ = la pátina está formada por numerosas colonias tipo B. N₁ = la pátina está formada por numerosas colonias tipo N. P = pátina muy abundante, blanquecina, mucosa y filante al efectuar la toma. D = pátina blanca, opaca, de borde liso.

A = turbidez uniforme, anillo. T = gran desarrollo y turbidez, sedimento. F = abundante desarrollo, sedimento floculado en el fondo y paredes.

c = cocos pequeños, en masas irregulares. C = cocos algo más grandes, en masas irregulares. b = bacilos cortos, móviles, en parejas y cadenas cortas. l = bacilos largos, anchos, rectos, en parejas y cadenas cortas.

Cuadro 2. Caracteres generales de las bacterias

Cepa	Gram	Catalasa	Litmus milk	Producción de gas a partir de					Producción de acidez a partir de					Grupo bacteriano
				Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Inulina	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Inulina	
B5-1	+	+	A+C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Cocos Gram ⁺ , catalasa ⁺
B5-2	+	+	A+C+Pe	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Cocos Gram ⁺ , catalasa ⁺
B5-4	+	+	A+C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Cocos Gram ⁺ , catalasa ⁺
B5-5	+	+	A+C+Pe	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Cocos Gram ⁺ , catalasa ⁺
M7-2	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
M7-3	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
M7-4	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
B7-1	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
B7-2	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
B7-3	+	-	A+C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Bacterias lácticas
B7-4	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
B7-5	-	+	Al+Pe	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Bacterias Gram ⁻
B7-6	+	-	A+C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Bacterias lácticas

Cuadros 2-5. AF = anaerobio facultativo. Fm = fermentación anaerobia del manitol. Ra = producción de ácido láctico inactivo, racémico. Litmus milk: A = acidificación; C = coagulación; R = reducción; Al = alcalinización; Pe = peptonización.

Cuadro 3. *Cocor*

Cepa	Ensayos de Baird-Parker		Fosfatasa	Fluidificación de la gelatina	Litmus milk	pH	Necesidades en oxígeno	Cromogénesis	Prueba de Kosser	Fosfato amónico como única fuente de nitrógeno	Reducción de nitratos	Producción de indol a partir de peptona	Producción de NH ₃ a partir de peptona
	Aerobio	Anaerobio											
Testigo			—	—		6,5			99	91	—	—	—
B5-1	+	+	—	—	A+C		AF	—	97	87	—	—	—
B5-2	+	+	+	+	A+C+Pe	4,9	AF	+	98	88	+	—	—
B5-4	+	+	—	—	A+C		AF	—	98	88	—	—	—
B5-5	+	+	+	+	A+C+Pe	4,9	AF	+	97	87	+	—	—

gram-positivos, catalasopositivos

Producción de NH ₃ a partir de arginina	Reacción de Voges-Proskauer	Rojo de metilo	Producción de acidez a partir de								Desarrollo a la t. ^a de		Desarrollo en CINA		Diagnóstico	
			Fructosa	Galactosa	Rafinosa	Trehalosa	Arabinosa	Xilosa	Sorbitol	Manitol	15°	45°	4 %	10 %		
-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	84	88	88	88	
+	+	6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	78	47	36	82	<i>St. epidermidis</i>
+	+	5,5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	15	30	15	20	<i>St. aureus</i>
+	+	6	+	+	-	+	-	-	-	-	-	78	47	40	85	<i>St. epidermidis</i>
+	+	5,5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	14	27	15	23	<i>St. aureus</i>

Cepa	
Acción sobre litmus milk	
Necesidades en oxígeno	
Fluidificación de la gelatina	
Reducción de nitratos	
Producción de indol a partir de peptona	
Producción de NH ₃ a partir de peptona	
Producción de NH ₃ a partir de arginina	
Pruebas de Kossel	
Fosfato amónico como única fuente de nitrógeno	
Reacción de Voges-Proskauer	
Rojo de metilo	
Homofermentación	
Naturaleza óptica del ácido láctico producido	
Fermentación anaerobia del manitol	

Cuadro 4.

Testigo																		
B7-3	A+R	AF	—	—	—	—	—	—	—	99	91	—	7	—	—	—	Ra	Fm
B7-6	A+R	AF	—	—	—	—	—	—	—	98	89	+	6,2	+	—	—	Ra	Fm

Bacterias lácticas

Desarrollo a la t. ^a de		Desarrollo en CINa		Producción de acidez a partir de										Diagnóstico	
				Fructosa	Galactosa	Rafinosa	Trehalosa	Melibiosa	Arabinosa	Xilosa	Sorbitol	Manitol	Amigdalina		
15 °C	45 °C	4 %	10 %	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
84	88	88	88	+	+	+	±	+	±	±	+	+	+		<i>Lactobacillus plantarum</i>
21	13	34	41	+	+	+	±	+	±	±	+	+	+		<i>L. plantarum</i>

Cuadro 5. Bacterias gram-negativas

Cepa	Litmus milk		pH	Fluidificación de la gelatina	Producción de ácido sulfhídrico	Producción de indol a partir de peptona	Producción de NH ₃ a partir de peptona	Producción de NH ₃ a partir de arginina	Reacción de Voges-Proskauer	Rojo de Metilo	Prueba de Kosser	Necesidades en oxígeno	Asimilación anaerobia del manitol	Fermentación de glucosa al				Diagnóstico
	Acción													2 %	5 %	10 %	20 %	
Testigo			6,5	—	—	—	—	—	—	7	99							
M7-2	Al+Pe		8,3	—	+	—	—	—	+	6,30	42	AF	+	0,47	0,26	0,26	0,2	<i>Zymomonas mobilis</i>
M7-3	Al+Pe		8,2	—	+	—	—	—	+	6,20	30	AF	+	1,47	2,31	6,25	10,47	<i>Z. mobilis</i>
B7-4	Al+Pe		8,3	—	+	—	—	—	+	6,25	37	AF	+					<i>Z. mobilis</i>
B7-1	Al+Pe		8,2	—	+	—	—	—	+	6,30	40	AF	+					<i>Z. mobilis</i>
B7-2	Al+Pe		8,2	—	+	—	—	—	+	6,20	30	AF	+					<i>Z. mobilis</i>
B7-4	Al+Pe		8,3	—	+	—	—	—	+	6,25	26	AF	+	1,55	2,6	6,47	10,31	<i>Z. mobilis</i>
B7-5	Al+Pe		8,2	—	+	—	—	—	+	6,30	30	AF	+					<i>Z. mobilis</i>

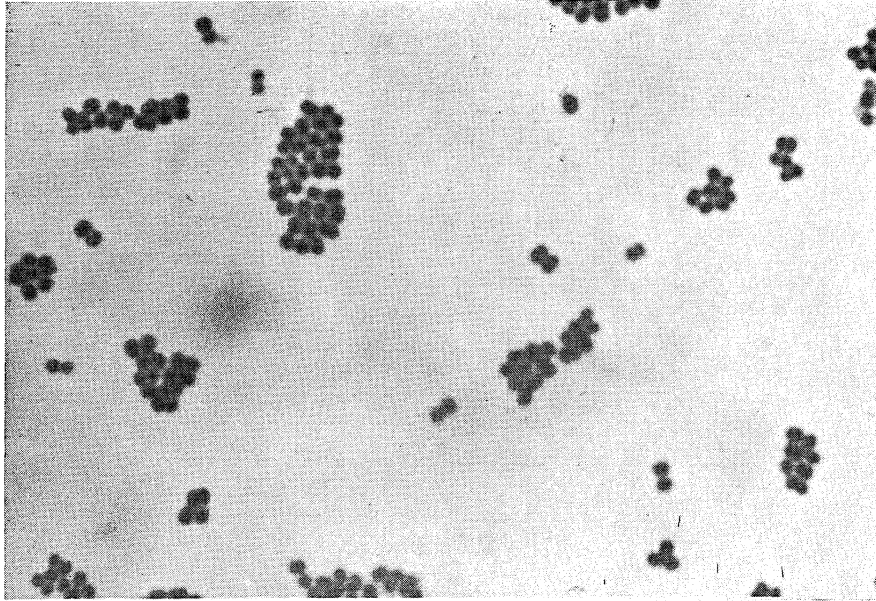


Figura 1. Staphylococcus aureus, B5-2. Aspecto microscópico

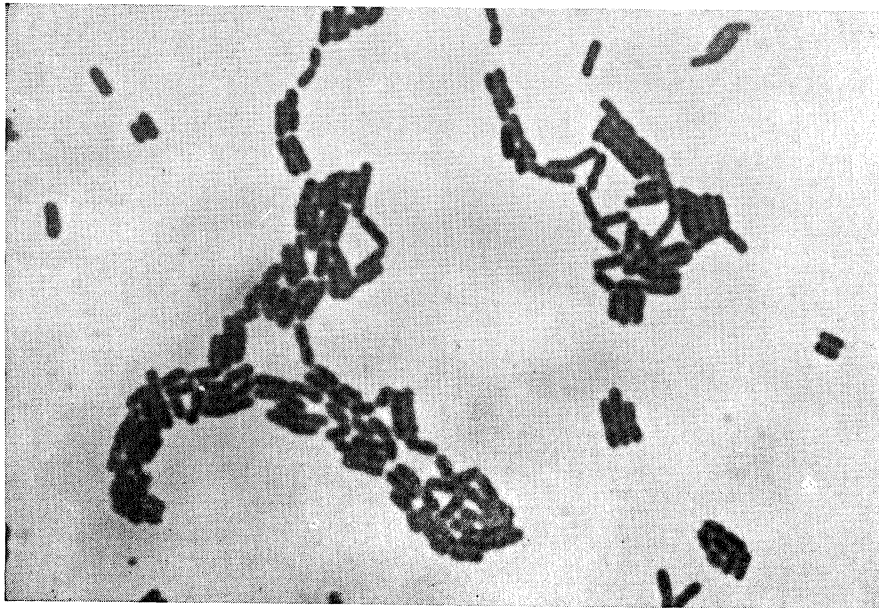


Figura 2. Lactobacillus plantarum, B7-3. Aspecto microscópico

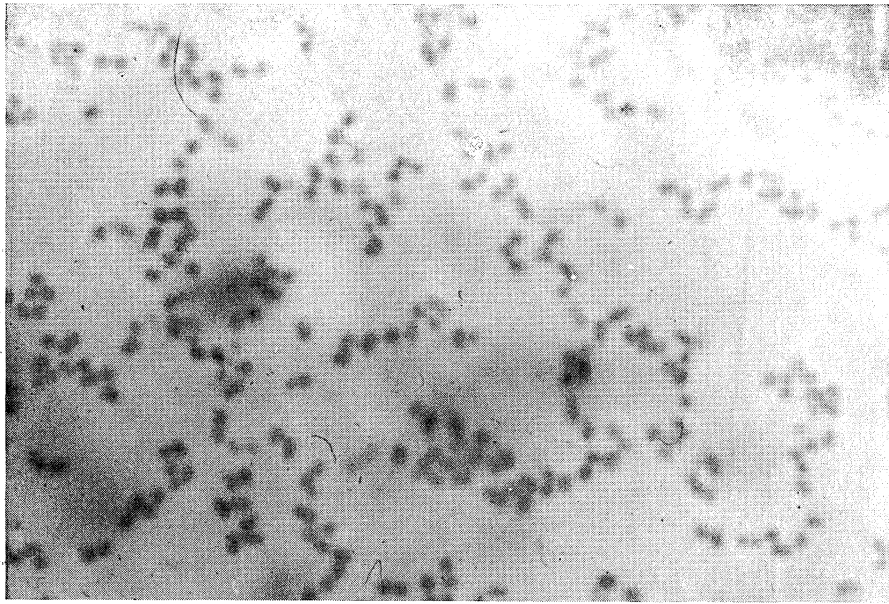


Figura 3. Zymomonas mobilis, B7-4. Aspecto microscópico

Entonces se pensó en el género *Zymomonas*, definido más recientemente (3) como formado por microorganismos que verifican una fermentación alcohólica de las hexosas, principalmente de glucosa, similar a la que efectúan las levaduras.

Hay dos especies bien descritas hasta ahora, de *Zymomonas*: *Z. anaerobia* y *Z. mobilis*. Y un grupo no bien estudiado.

La primera, aislada por Shimweel (18) en 1937, se caracteriza por ser estrictamente anaerobia. Esto excluye a nuestras cepas, que son anaerobias facultativas.

La segunda, descrita por Lindner en 1928 y revisada por Kluyver y van Niel (9) en 1936, coincide con las nuestras en la totalidad de las pruebas que dichos autores mencionan.

Pero a las cepas aisladas de la margarina se les ha verificado además: reacción de Voges-Proskauer, producción de sulfhídrico, acción sobre el litmus milk... que en ningún trabajo se han indicado, por lo que no podemos asegurar su completa identidad con la especie descrita.

Nosotros, por tanto, limitándonos a las especies establecidas, por carecer de puntos de comparación para pensar en describir una especie nueva, clasificamos este tipo de bacterias como *Zymomonas mobilis*.

En las margarinas saladas es muy frecuente la contaminación estafilocócica, que se hace dominante, deteniendo el desarrollo de otras posibles especies presentes, por actuar a modo de medio de enriquecimiento en *Staphylococcus*. El cloruro sódico, que en general inhibe el crecimiento bacteriano, lo favorece en este caso por el carácter halófilo que poseen.

Las margarinas resultan peligrosas en estas condiciones y ocasionan toxi-infecciones alimentarias, a causa de las exotoxinas (hematoxina, dermatoxina...) y una potente enterotoxina, producidas por los *Staphylococcus*.

La infección, de origen humano, hay que atribuirle a falta de control y de educación higiénica del personal.

En las margarinas "dulces" hemos encontrado *Zymomonas* y lactobacilos. Los primeros proceden del ambiente; y los segundos pueden haber sido introducidos accidentalmente con la leche o con las soluciones de lactosa y ácido láctico que la sustituyen (20), o voluntariamente, ya que es frecuente en la tecnología de la margarina, conseguir una mayor acidez usando leche acidificada por cultivos lácticos (21).

RESUMEN

Es evidente que en las margarinas analizadas existe una infección microbiana, no aportada por las materias primas utilizadas en su elaboración.

Los gérmenes contaminantes pertenecen a distintos grupos microbiológicos: cocos gram-positivos, catalasopositivos; bacterias lácticas y bacterias gram-negativas.

Verificándose un estudio taxonómico completo de 13 cepas representativas de todas las especies aisladas, se llega a su identificación como: *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, grupo V de Rosenbach, *Lactobacillus plantarum* y *Zymomonas mobilis*.

En las margarinas saladas es frecuente la presencia de *Staphylococcus*, favorecidos por el mayor contenido en sal y el carácter halófilo que poseen.

La contaminación, de origen humano, inutiliza la margarina para ser consumida, pues causaría intoxicaciones.

En las dulces, encontramos principalmente lactobacilos y *Zymomonas*. Los primeros pueden haber sido introducidos voluntariamente, para obtener una mayor acidificación y ayudar a su conservación. Los segundos son ambientales.

SUMMARY

Microorganisms in spoiled margarines. II. Isolation and identification of bacteria

In the study of microbiological spoilage on margarines a large number of bacteria were isolated, which were not coming from the raw materials employed in their manufacture.

Isolation media and procedure, incubation conditions, as well as tests were carried-out for identifying the complete strains found from margarine samples, are explained.

Taxonomic study interpretation led up to recognition of isolated microorganisms, as follows:

Staphylococcus aureus and *St. epidermidis* for Gram-positive, catalase-positive cocci;

Lactobacillus plantarum for lactic acid bacteria; and

Zymomonas mobilis for Gram-negative ones.

Staphylococcal contaminations are often found in salted margarines, because a high salt content is favorable to them, accordingly with their halophilic character. These strains, from human source, lose its overall value; and margarines are refused in sanitary checks in order to bring on intoxications.

Sweet margarines have *Lactobacillus* and *Zymomonas* as the most important population; first ones may be added on purpose for acidifying and increasing their shelf-life. *Zymomonas* come from the air.

BIBLIOGRAFIA

1. BAIRD-PARKER, A. C. Methods for classifying staphylococci and micrococci. En B. M. GIBBS y F. A. SKINNER. 1966. Identification Methods for Microbiologists (A). Academic Press, Londres y Nueva York.
2. BARRE, P. 1961. Ann. Technol. Agr., 15, 225.
3. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., y SMITH, N. R. 1957. Bergey's Manual Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
4. BUTTIAUX, R., y GAGNON, P. 1959. Ann. Inst. Pasteur, Lille, 10, 121.
5. CASTAÑÓN, M. 1970. Tesis doctoral.
6. CASTAÑÓN, M., e IÑIGO, B. 1971. Microbiol. Españ., 24, 39.
7. GIBSON, T., y ABD-EL-MALEK, J. 1945. J. Dairy Res., 14, 35.
8. HARRIGAN, W. F., y MCCANCE, E. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, Londres y Nueva York.
9. KLUYVER, A., y NIEL, C. B. van. 1936. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 94, 369.
10. MARTÍN, M. 1967. Grasas Aceites, 18, 312.
11. MOSSEL, D. A. A. 1965. Fette Seifen Anstrichm., 67, 901.
12. MOSSEL, D. A. A., y MARTIN, G. 1961. Ann. Inst. Pasteur Lille, 12, 225.
13. ORLA-JENSEN, S. 1929. Mem. Acad. Roy. Sci. Dan., Ser. 8, 81.
14. ROGOSA, M.; WISEMAN, R. F.; MITCHELL, I. A., y DISRAELLI. 1959. J. Bacteriol., 65, 681.
15. RUIZ-DE-GORDEJUELA, E. 1969. Alimentaria, 26, 19.
16. SEMICHON, L., y FLANZY, M. 1929, 1930. Ann. Fals. Fraudes, 22, 139; 23, 247.
17. SHARPE, M. E.; FRYER, T. F., y SMITH, D. G. Identification of the lactic acid bacteria. En B. M. GIBBS y F. A. SKINNER. 1966. Identification Methods for Microbiologists (A). Academic Press, Londres y Nueva York.
18. SHIMWEEL, J. 1937. J. Inst. Brew. London, 43, 507.
19. Society of American Bacteriologists. 1954. Manual of Pure Culture Study of Bacteria. Geneva, N. Y.
20. Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill Book Company, Inc.
21. STÄRKLE. 1924. Biochem. Z., 151, 371.

CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Por acuerdo de la Sociedad Española de Microbiología se celebrará el III Congreso Nacional de Microbiología, en Barcelona, durante los días 3-5 del próximo mes de junio. El Presidente del Comité Organizador es el Prof. A. Pumarola, Vicepresidente de la Sociedad; el Secretario del Comité, el Dr. A. Rodríguez Torres, Facultad de Medicina, Cátedra de Microbiología, Casanova, 143, Barcelona-11.

NUEVA ENTIDAD BIOLOGICA

Acaba de aparecer el número 1 de "Biotechnology", boletín oficial de la Organización Internacional para el Desarrollo de la Biotecnología y la Bioingeniería. La nueva entidad, de carácter no comercial, que agrupa a Institutos y Laboratorios dedicados a Biotecnología y Microbiología Aplicada, tiene como objetivo el fomento de dichas materias, en beneficio, principalmente, de los países en desarrollo, mediante la creación de laboratorios especializados, mantenimiento de relaciones con organizaciones internacionales afines, simposios, cursos y reuniones.

El Presidente de la Organización es el Prof. H. G. Gyllenberg (Finlandia); Vicepresidente, el Prof. G. Terui (Japón); Secretario-Tesorero, el Prof. E. L. Gaden, Columbia University, Department of Chemical Engineering, New York, N. Y. 10027 (Estados Unidos de América del Norte).

CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Por acuerdo de la Sociedad Española de Microbiología se celebrará el III Congreso Nacional de Microbiología, en Barcelona, durante los días 3-5 del próximo mes de junio. El Presidente del Comité Organizador es el Prof. A. Pumarola, Vicepresidente de la Sociedad; el Secretario del Comité, el Dr. A. Rodríguez Torres, Facultad de Medicina, Cátedra de Microbiología, Casanova, 143, Barcelona-11.

NUEVA ENTIDAD BIOLOGICA

Acaba de aparecer el número 1 de "Biotechnology", boletín oficial de la Organización Internacional para el Desarrollo de la Biotecnología y la Bioingeniería. La nueva entidad, de carácter no comercial, que agrupa a Institutos y Laboratorios dedicados a Biotecnología y Microbiología Aplicada, tiene como objetivo el fomento de dichas materias, en beneficio, principalmente, de los países en desarrollo, mediante la creación de laboratorios especializados, mantenimiento de relaciones con organizaciones internacionales afines, simposios, cursos y reuniones.

El Presidente de la Organización es el Prof. H. G. Gyllenberg (Finlandia); Vicepresidente, el Prof. G. Terui (Japón); Secretario-Tesorero, el Prof. E. L. Gaden, Columbia University, Department of Chemical Engineering, New York, N. Y. 10027 (Estados Unidos de América del Norte).

Depósito legal: M. 702 - 1968

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid